

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – UFPEL
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Comparação de Métodos Fenotípicos e Molecular 3M MDS[®] para Identificação
de *Salmonella* spp.**

Greici Bergamo

Pelotas, 2015

Greici Bergamo

**Comparação de Métodos Fenotípicos e Molecular 3M MDS[®] para Identificação
de *Salmonella* spp.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Co-orientadores: Prof. Dr. Cláudio Dias Timm

Prof^a. Dr^a. Elizabete Helbig

Pelotas, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B493c Bergamo, Greici

Comparação de métodos fenotípicos e molecular 3M MDS® para Identificação de *Salmonella* spp. / Greici Bergamo; Eliezer Ávila Gandra, orientador; Cláudio Dias Timm e Elizabete Helbig, coorientadores. - Pelotas, 2015.

106 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Agar MSRV. 2. Linguíça frescal. 3. Multirresistência.
4. Tetracionato. I. Gandra, Eliezer Ávila, orient. II. Timm, Cláudio Dias, coorient. III. Helbig, Elizabete, coorient. IV. Título.

CDD: 641.1

Greici Bergamo

Comparação de Métodos Fenotípicos e Molecular 3M MDS[®] para Identificação de *Salmonella* spp.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24 de fevereiro de 2015.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra (Orientador)
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof^a. Dr^a. Helenice Gonzalez de Lima
Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof^a. Dr^a. Kelly Lameiro Rodrigues
Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Augusto Schneider (Suplente)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Co-orientador)
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof^a. Dr^a. Elizabete Helbig (Co-orientadora)
Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento trabalho.

À Empresa 3M *Food Safety* pelo empréstimo do equipamento 3M MDS® para análise molecular, em especial a Dalton Greco, Daniel Tasca e Leonardo Teixeira que sempre foram solícitos e não mediram esforços para que a pesquisa fosse concluída.

À empresa BRF S.A., em especial à Ivair Gonçalves da Silva, pela gentileza em ceder o ágar MSRV e o suplemento utilizado no preparo do meio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos por disponibilizar a estrutura laboratorial e os demais meios e materiais, em especial as Professoras Jozi Mello e Kelly Lameiro, e as Técnicas de Laboratório Rosimeri Rossales, Evelise Sampaio e Joana.

À Natália Rodrigues Carvalho por ter abdicado de finais de semana e feriados para colaborar na realização das análises.

Meu eterno agradecimento ao meu orientador Eliezer Avila Gandra, que sempre esteve disposto a me ensinar e auxiliar no que fosse possível, sem sua ajuda nada disso seria possível.

Ao meus co-orientadores Claudio Dias Timm e Elizabete Helbing que sempre estiveram dispostos a ajudar.

À Prof^a. Dr^a. Helenice Gonzalez de Lima pelas valiosas correções feitas no projeto de pesquisa.

À minha família, que desde o começo sempre me incentivaram a estudar e mesmo a 17 horas de distância sempre se mantiveram presentes nas ligações diárias.

A Alan Cássio Borsuk pelo apoio e estímulo.

E a Deus, por ter me mostrado que a fé enriquece a alma e fortalece.

Resumo

Foram avaliados e comparados um método molecular (*Molecular Detection System* - 3M MDS®) e dois métodos fenotípicos (MAPA e MSRV) na detecção de *Salmonella* spp. Dois métodos utilizam como base meios de cultura, sendo que o Método MAPA é considerado padrão no Brasil, é recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e está descrito na Instrução Normativa N.62 e o Método MSRV que é descrito pela *International Organization for Standardization*. O terceiro método, 3M MDS®, é validado pela *Association of Official Analytical Chemistry* e baseia-se em princípios de biologia molecular detectando o micro-organismo alvo através de bioluminescência. Os três métodos foram avaliados quando a sua capacidade de detectar *Salmonella* spp. em amostras de leite UHT artificialmente contaminado e em amostras de linguiças mista frescal (elaborada com carne suína e bovina) e suína frescal adquiridas em estabelecimentos comerciais da Região Sul do Brasil. A partir dos isolados encontrados nas amostras de produtos cárneos, foi avaliada a capacidade de resistência a agentes antimicrobianos e de formação de biofilme em superfícies de poliestireno. Todos os métodos foram capazes de detectar um número equivalente de isolados de *Salmonella* spp. tanto nas amostras de leite UHT contaminadas artificialmente como em amostras de produtos cárneos. A sensibilidade e especificidade dos métodos foram equivalentes. A presença de *Salmonella* spp. foi observada em 19,1% (n=89) das amostras de produtos cárneos, estando essas impróprias para o consumo. Dos isolados obtidos, 40%(n=15) mostraram-se resistentes a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados e os que apresentaram menor eficiência foram a ampicilina, gentamicina e amoxicilina mais clavulanato. Apenas um antimicrobiano amicacina (30µg) foi eficaz na inibição de todos os isolados testados. Nenhum dos isolados mostrou-se capaz de formar biofilmes em superfícies de poliestireno. A partir dos dados obtidos pode-se inferir que tanto o Método 3M MDS®, quanto o Método MSRV podem ser utilizados como alternativas ao Método MAPA, considerado padrão no Brasil. A presença de *Salmonella* spp. observada nas amostras analisadas denotam falhas e falta de cuidados higiênicos na cadeia de carnes e a resistência bacteriana verificada nos isolados de *Salmonella* spp. a agentes antimicrobianos é preocupante pois bactérias resistentes podem gerar infecções de difícil tratamento.

Abstract

One molecular method (*Molecular Detection System* - 3M MDS[®]) and two phenotypic methods (MAPA and MSRV) were evaluated and compared for the identification of *Salmonella* spp. in UHT milk artificially contaminated samples and mixed sausage frescal samples (manufactured using meat swine and meat beef) and swine sausage frescal samples bought in commercial markets in Southern Brazil. Two methods use the culture media: the MAPA method is considered standard in Brazil and is recommended by Ministry of Agriculture, Livestock and Supply and is described in Normative Instruction n.62 and MSRV method is recommended by *International Organization for Standardization*. The 3M MDS[®] method is recommended by *Association of Official Analytical Chemistry*, based on principles of molecular biology detecting the microorganism by bioluminescence. *Salmonella* spp. isolates found in the samples of meat products was evaluated the antimicrobial resistance and biofilm formation on polystyrene surfaces. All methods detect an equivalent number of *Salmonella* spp. isolates in UHT milk artificially contaminated samples and meat products. The sensitivity and specificity of both methods are equivalent. The presence of *Salmonella* spp. was observed in 19,1% (n=89) of the meat products samples and the antimicrobial resistance in *Salmonella* spp. isolates was 40% (n=15). Less efficient antibiotics: ampicillin, gentamicin and amoxicillin+clavulanate. Only one antibiotic - amikacin (30µg) - was effective in inhibiting all isolates tested. No *Salmonella* spp. isolate biofilms formed on polystyrene surfaces. The MSRV and 3M MDS[®] methods can be used as alternatives to the standard method MAPA. The presence of *Salmonella* spp. in meat products demonstrates flaws and lack of hygienic care in the meat chain and the resistance to antibiotics found in isolates of *Salmonella* spp. is worrying because the bacterial resistance can cause infections difficult to treat.

Lista de Figuras

Figura 1 - Caldos de Enriquecimento Seletivo para após inoculação das amostras.	20
Figura 3 – Ágar Semissólido Rappaport-Vassiliadis após 24 horas de incubação, suspeito para a presença de <i>Salmonella</i> spp.....	21
Figura 2 – Ágar Semissólido Rappaport-Vassiliadis após 24 horas de incubação, negativo para a presença de <i>Salmonella</i> spp.....	21
Figura 4 – Software do sistema de detecção de patógenos 3M MDS® após 15 minutos de análise.	29
Figura 5 – Software do sistema de detecção de patógenos 3M MDS® após 75 minutos de análise.	29

Artigo 2

Figura 1 – Média percentual de amostras de campo (linguiças mista frescal e suína frescal) com resultados falsos positivos obtidos em etapas parciais dos Métodos MAPA, MSRV e 3M MDS®.	91
--	----

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1 - Presença de <i>Salmonella</i> spp. em 25 gramas de produtos cárneos comercializados na Região Sul do Rio Grande do Sul.....	74
Tabela 2 - Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de <i>Salmonella</i> spp. provenientes de produtos cárneos comercializados na Região Sul do Rio Grande do Sul	76

Artigo 2

Tabela 1 – Verificação da presença de <i>Salmonella</i> spp. através dos Métodos MAPA, MSRV e 3M MDS® em amostras de leite integral UHT contaminadas artificialmente.	88
Tabela 2 - Verificação da presença de <i>Salmonella</i> spp. em amostras de linguiça mista frescal (suína e bovina) e suína frescal através dos Métodos MAPA, MSRV e 3M MDS®	89
Tabela 3 - Número de amostras positivas, negativas, falso positivas e falso negativas obtidas nos três métodos de análise de leite UHT contaminado artificialmente.....	89
Tabela 4 - Avaliação da especificidade e sensibilidade dos Métodos MAPA, MSRV e 3M MDS® para análise de leite UHT contaminado artificialmente.	89
Tabela 5 - Resultados falso positivos (FP) em etapas parciais dos Métodos MAPA, MSRV e 3M MDS® na verificação da presença de <i>Salmonella</i> spp. em amostras de linguiça mista frescal (suína e bovina) e suína frescal	90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Justificativa	11
1.2 Objetivo Geral	11
1.2.1 Objetivos Específicos	11
1.3 Hipóteses	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>Salmonella</i> spp.: Características, Surtos, Contaminação e Legislação	13
2.2 Métodos para Detecção de <i>Salmonella</i> spp.	17
2.2.1 Método MAPA	17
2.2.2 Método Semissólido Rappaport Vassiliadis – MSRV	18
2.2.3 Meios de Cultura Utilizados nos Métodos MAPA e MSRV	19
2.2.3.1 Pré-Enriquecimento não Seletivo	19
2.2.3.2 Enriquecimento Seletivo	19
2.2.3.3 Isolamento e Seleção	21
2.2.3.4 Identificação Bioquímica – Meios de Triagem	23
2.2.3.5 Confirmação Sorológica	26
2.2.4 Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification - LAMP	26
2.3 Resistência Antimicrobiana.....	30
2.4 Capacidade de Formação de Biofilme	32
3 PROJETO DE PESQUISA	34
4 RELATÓRIO DE TRABALHO DE CAMPO	68
5 ARTIGOS	69
5.1 Artigo 1	70
5.2 Artigo 2	81
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais micro-organismos investigados em produtos alimentícios é *Salmonella* spp. A falta de higiene na preparação dos alimentos, bem como o processamento e a estocagem inadequada facilitam a multiplicação desse micro-organismo (BOROWSKY, 2005).

Salmonella spp. pode afetar a todos os indivíduos, principalmente os mais susceptíveis como idosos, crianças e imunodeprimidos, podendo causar doenças graves que necessitam de hospitalização e de um cuidado rigoroso, representando altos custos sociais e econômicos (PERESI, 1998).

Muitos países exigem a ausência desse micro-organismo como requisito mínimo para a importação de produtos alimentícios. A obtenção de dados confiáveis sobre a presença/ausência de *Salmonella* spp. em produtos avalizam a qualidade do alimento e ganham a confiança do consumidor (JAY, 1992 citado por BOROWSKY, 2005). Por isso, cabe às empresas do setor de alimentos e bebidas garantir a qualidade microbiológica de seus produtos e para isso é necessário que sejam analisados insumos e produtos prontos para o consumo através de métodos com elevada sensibilidade e especificidade de forma rápida e precisa, garantindo assim que os resultados sejam confiáveis e entregues em curto espaço de tempo.

Segundo Reis et al. (2002), os métodos para detecção de *Salmonella* spp. incluem as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos e identificação das colônias características por meio de testes bioquímicos e sorológicos.

As várias etapas e o longo tempo para se obter uma resposta necessária nas técnicas convencionais fazem com que métodos utilizando novas técnicas para pesquisa de *Salmonella* spp. em alimentos venham sendo desenvolvidos, objetivando principalmente a diminuição do tempo de análise, a redução de trabalho laboratorial, o aumento da sensibilidade e a precisão dos resultados.

Métodos alternativos, utilizando meios de cultura diferenciais, atualmente são uma opção na tentativa de reduzir tempo, trabalho e custos. O método preconizado pela International Organization for Standardization – ISO (ISO, 2007) utiliza um meio semissólido, conhecido como MSRV – Meio Semissólido Rappaport Vassiliadis. Esse método permite a observação do resultado presuntivo em 48h, 24h

menos em comparação ao método padrão brasileiro preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2003).

Técnicas moleculares para detecção de micro-organismos em alimentos também são alternativas para diminuir o tempo de resposta dos resultados. Alguns métodos permitem identificar o micro-organismo através da amplificação de ácidos nucleicos em amostras pré-enriquecidas e neste contexto está o *Molecular Detection System* (3M MDS®) da Empresa 3M Food Safety. O método permite identificar o micro-organismo alvo através da amplificação isotérmica de DNA com detecção por bioluminescência. A técnica garante a precisão dos resultados e a otimização de tempo e espaço podendo ser utilizado em alimentos e bebidas (SANTOS, 2013).

Outra preocupação com micro-organismos patogênicos está na sua capacidade de sobreviver a ação de antibióticos, também conhecida como resistência a antimicrobianos. Muitas vezes, as infecções causadas por micro-organismos resistentes não respondem ao tratamento padrão, resultando em doença prolongada e maior risco de morte além de custos mais elevados. Por isso, é de extrema importância avaliar essa capacidade em micro-organismos patogênicos isolados (WHO, 2013).

As fímbrias, presentes em muitas bactérias como *Salmonella* spp., são um dos mecanismos responsáveis por facilitar a adesão dos micro-organismos em superfícies e colonizar o local formando biofilmes (GIBSON et al., 2007). Ao fazer parte da estrutura de um biofilme, as bactérias tornam-se mais tolerantes ao estresse e passam a ter maior resistência a antibióticos e desinfetantes, o que dificulta a sua eliminação. Existe ainda a preocupação do biofilme atuar como um substrato, atraindo bactérias que normalmente não teriam a capacidade de formar biofilme. Esses fatores são muito preocupantes nas linhas de produção de indústrias alimentícias, uma vez que a grande concentração de células aderidas aos equipamentos podem facilmente contaminar lotes inteiros de produtos (LAPIDOT, ROMLING e YARON, 2006).

Diante da necessidade de técnicas rápidas, sensíveis e precisas para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, no presente estudo foi realizada uma comparação entre métodos convencionais fenotípicos comumente utilizados e o Método 3M MDS® para identificação deste micro-organismo. A partir das cepas

isoladas pelos métodos citados, foram feitos testes de resistência a antimicrobianos e verificação da capacidade de formação de biofilme.

1.1 Justificativa

Como ainda não é possível erradicar totalmente *Salmonella* spp. dos ambientes de produção de alimentos espera-se, através dos resultados obtidos, contribuir com informações para escolha de métodos mais adequados em função dos propósitos para identificação deste micro-organismo com aplicabilidade a indústrias de alimentos e laboratórios de pesquisa. Dessa forma, visou-se colaborar com as indústrias brasileiras do setor e com os laboratórios que poderão utilizar os resultados desse experimento na escolha de um método confiável. Também foi avaliada a presença de *Salmonella* spp. em produtos cárneos comercializados na Região Sul do Rio Grande do Sul, de forma a contribuir com informações sobre a qualidade microbiológica destes produtos. Por fim, a fim de conhecer as características relacionadas a disseminação deste micro-organismo e a problemas de saúde pública que possam ser ocasionados por esta bactéria, a partir dos isolados obtidos de produtos cárneos foram realizados testes de resistência a antimicrobianos e de verificação da capacidade de formação de biofilme em superfícies de poliestireno.

1.2 Objetivo Geral

Estudar o método mais sensível e específico para identificação de *Salmonella* spp. em amostras de produtos cárneos e em amostras de leite artificialmente contaminadas e avaliar nos isolados obtidos em produtos cárneos a resistência a antimicrobianos e a capacidade de formação de biofilme.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar e comparar um método molecular e um método fenotípico com o método fenotípico oficial no país para identificação de *Salmonella* spp. em produtos cárneos;

- Avaliar e comparar um método molecular e um método fenotípico com a metodologia fenotípica oficial no país para identificação de *Salmonella* spp. em amostras de leite artificialmente contaminadas com micro-organismos previamente isolados de diferentes alimentos a base de carne;
- Avaliar a presença de *Salmonella* spp. em produtos cárneos vendidos em estabelecimentos comerciais da cidade de Pelotas-RS;
- Avaliar a resistência a agentes antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. provenientes de amostras de produtos cárneos;
- Avaliar capacidade de formação de biofilme de isolados de *Salmonella* spp. provenientes de amostras de produtos cárneos.

1.3 Hipóteses

- O Método Semissólido Rappaport Vassiliadis – MSRV (ISO, 2007) e o Método Molecular da Empresa 3M *Food Safety* (AOAC, 2012) apresentam sensibilidade e especificidade equivalente ao Método Oficial descrito na Instrução Normativa N.62 (BRASIL, 2003) para identificação de *Salmonella* spp. em amostras de leite contaminado artificialmente e em produtos cárneos;
- *Salmonella* spp. está presente em amostras de produtos cárneos adquiridas em estabelecimentos comerciais da Cidade de Pelotas – RS.
- Isolados de *Salmonella* spp. obtidos a partir de amostras de produtos cárneos são resistentes a agentes antimicrobianos comumente utilizados para bactérias gram-negativas e são formadores de biofilme em superfícies de poliestireno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Salmonella* spp.: Características, Surtos, Contaminação e Legislação

O gênero *Salmonella* spp. pertence à Família *Enterobacteriaceae* e é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* subdivide-se em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica* (SILVA, 2010).

São bacilos Gram negativos, não formam esporos, anaeróbios facultativos e geralmente são móveis. Com exceção dos sorotipos *S. typhi*, *S. pullorum* e *S. gallinarum*, a maioria fermenta carboidratos como glicose, arabionose, maltose, manitol, dulcitol, xilose, ramnose, trealose e xilose. A partir da redução do enxofre, produzem gás sulfídrico. São oxidase e uréia negativos e positivos para catalase, indol, vermelho de metila e Voges-Proskauer. Tem a capacidade de reduzir nitratos a nitritos, descarboxilam os aminoácidos lisina e ornitina e utilizam citrato como única fonte de carbono. Ressalta-se, no entanto, que essas características podem variar em função do sorovar ou da subespécie. A temperatura ótima de crescimento varia entre 35°C a 43°C podendo crescer também entre 5°C e 46°C, porém, por ser sensível ao calor, não sobrevivem a temperaturas superiores a 70°C. O pH de crescimento ótimo varia entre 7,0 a 7,5, conseguindo sobreviver em pH de 3,8 a 9,5, e o valor mínimo de atividade de água para crescimento é de 0,94 (LÁZARO et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Esse micro-organismo habita principalmente o aparelho gastrointestinal de humanos e animais, podendo se adaptar a vários tipos de hospedeiros. Porém, alguns sorotipos são restritos a um hospedeiro como a *S. abortusovis* em ovinos, *S. gallinarum* em aves, *S. typhi*, *paratyphi A* e *C* em humanos, *S. dublin* em bovinos, *S. choleraesuis* e *S. typhisuis* em suínos. Embora seja raro, a *S. dublin* e a *S. choleraesuis* também podem ter como hospedeiro humanos (jovens, idosos ou imunocomprometidos) (LÁZARO et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Salmonella spp. pode causar doenças em animais e em seres humanos por meio da ingestão de alimentos contaminados podendo ser fatal em crianças, adultos imunocomprometidos e idosos por apresentarem baixa resistência às infecções. A dose infectante estimada varia de 10^5 a 10^8 células em indivíduos saudáveis, porém,

alguns sorovares podem desencadear os sintomas em concentrações $\leq 10^3$ células. A maioria das espécies, como os sorotipos *S. enteritidis* e *S. typhimurium* (mais comumente envolvidos na transmissão de salmonelose) atacam o indivíduo através do contato oral, percorrem o estômago e se instalam na mucosa intestinal onde desencadeiam a enterocolite aguda. Os sintomas são caracterizados por vômitos, náuseas, cefaléia, calafrios, diarreia (podendo, em alguns casos, ser sanguinolenta) e dores abdominais após 12 a 14 horas da ingestão do alimento contaminado. Normalmente o organismo consegue se recuperar naturalmente e, em casos de internações, a melhora dá-se em até quatro dias. Algumas pessoas tem o contato com a bactéria e não apresentam sintomas, porém, podem transmitir a doença através das fezes. As espécies *S. typhi* e *S. paratyphi* provocam septicemia e febre tifoide ou paratifóide em humanos podendo lesionar vários órgãos e, nesse caso, os sintomas iniciais são febre prolongada, alterações intestinais como diarreia ou constipação, dores de cabeça, mal-estar, falta de apetite, dores abdominais, náuseas e vômitos. Em alguns pacientes aparecem manchas rosadas no abdômen e tórax. Diferentemente das outras espécies, a infecção causada por *S. typhi* e *S. paratyphi* não desaparece sozinha e, sem tratamento, os sintomas se agravam podendo levar o paciente a óbito (JAY, 2005; LÁZARO et al., 2008; PERESI, 1998; PINTO et al., 2004; SILVA et al., 2010).

O ciclo de contaminação por *Salmonella* spp. ocorre principalmente pelo processo fecal-oral. Esse micro-organismo é eliminado pelas fezes, tanto por pacientes que apresentam os sintomas da doença quanto pelos portadores assintomáticos, e disseminam-se pela água e solo. Podem resistir durante 2 anos em fezes secas de aves e bovinos, 9 meses em solo cultivado e 4 meses em pastagens e, por esse motivo, produtos de origem vegetal e animal, leite e ovos, são frequentemente expostos a contaminação. No caso de produtos industrializados ou que passam por algum tipo de processamento, essa contaminação ocorre durante o preparo ou elaboração através do contato com alimentos ou superfícies contaminadas (GOUVÊA, 2009; GREIG e RAVEL, 2009; LÁZARO et al., 2008).

Alguns fatores importantes a serem considerados e controlados para evitar a disseminação da *Salmonella* spp. nos ambientes de produção incluem a limpeza e desinfecção das instalações, evitando assim o contato dos animais com as fezes, controle da entrada de animais portadores de salmonelose no rebanho e

monitoramento da qualidade microbiológica da alimentação ofertada a esses animais (BOROWSKY, 2005).

Pesquisas de *Salmonella* spp. vem sendo realizadas no Brasil como forma de se averiguar a qualidade higiênicossanitária em vários tipos de alimentos. Os resultados obtidos variam conforme o tipo de produto e a região onde o mesmo foi coletado.

Beraldo-Massoli et al. (2013) não encontraram presença de *Salmonella* spp. nas 54 amostras de cortes de frango analisadas. As amostras provinham de estabelecimentos comerciais localizados na Cidade de Jaboticabal, em São Paulo. Yamaguchi et al. (2013) avaliaram 82 carcaças de frango coletadas na Cidade de Maringá, Paraná, e encontrou presença de *Salmonella* spp. em apenas 3 delas.

Em relação a carne suína, Souza (2012) encontrou presença de *Salmonella* spp. em 26,32% das 19 amostras de cortes suínos coletadas em feiras livres localizadas na Microrregião do Brejo Paraibano. Sales et al. (2013) analisaram 20 amostras de cortes suínos coletadas em estabelecimentos comerciais de Mossoró, Rio Grande do Norte, e encontraram presença de *Salmonella* spp. em 25% delas.

Em Alexandria, Rio Grande do Norte, um estudo avaliou cortes bovinos provenientes de estabelecimentos comerciais locais e, do total de 25 amostras, 16% delas apresentaram presença do micro-organismo (SILVESTRE, 2013). Leite-Júnior et al. (2013) não encontraram presença de *Salmonella* spp. ao analisar 25 amostras de carne moída bovina coletadas em estabelecimentos comerciais de vários municípios situados no Estado de Minas Gerais.

Perdoncini et al. (2014) avaliou 20 pools de ovos produzidos em sistema agroecológico e não detectaram presença de *Salmonella* spp. na casca e no conteúdo interno. Gomes-Filho et al. (2014) analisaram 90 amostras de ovos coletados em feiras livres e em criatórios localizados em Fortaleza, Ceará, e também não encontraram presença de *Salmonella* spp. na casca e no conteúdo interno. Oliveira e Taham (2011) avaliaram 18 amostras de ovos coletadas em estabelecimentos comerciais da Região do Distrito Federal e encontraram presença de *Salmonella* spp. em 6 amostras, porém não foi especificado qual parte do ovo foi avaliada (parte interna, externa ou ambas).

Embora o primeiro surto de salmonelose tenha sido descrito em 1888 na Alemanha, a frequência de casos começou a ser percebida a partir da década de 70 na Europa e nos Estados Unidos (SHINOHARA, 2008).

No ano de 2010, doze pessoas foram infectadas por *Salmonella* após ingestão de hambúrgueres produzidos com carne de peru. Os casos ocorreram em 10 estados Norte Americanos e envolveram a cepa *hadar*, resistente a muitos antibióticos (CDC, 2011).

Em 2012, 46 pessoas apresentaram sintomas relacionados a salmonelose após o consumo de carne moída bovina contaminada com *Salmonella enteritidis* e 12 pacientes precisaram de cuidados hospitalares. O surto ocorreu em 9 Estados nos Estados Unidos e o Departamento de Agricultura norte americano fez *recall* do lote suspeito (CDC, 2012). Também envolvendo carne moída, 22 pessoas ficaram enfermas após o consumo do produto contaminado com *Salmonella typhimurium* nos Estados Unidos, em 2013 (CDC, 2013a).

Após o consumo de sushis, 116 pessoas passaram mal e 12 precisaram de cuidados hospitalares nos Estados Unidos. O atum utilizado para a preparação do alimento estava contaminado com *Salmonella bareilly*. Os relatos ocorreram em 20 estados e o produto foi recolhido dos locais de comercialização (FDA, 2012).

Em outubro de 2013, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos registrou um surto envolvendo carne de frango contaminada com *Salmonella heidelberg*, onde aproximadamente 278 pessoas foram afetadas em 18 Estados Norte Americanos (USDA, 2013). Outro surto também registrado em 2013 resultou em 16 pessoas infectadas e 1 morte nos Estados Unidos após consumo de pasta de gergelim. O produto estava contaminado com *Salmonella montevideo* e *Salmonella mbandaka* (CDC, 2013b).

No Brasil, entre os anos de 2000 a abril de 2013, as Regiões Sul e Sudeste foram as que mais registraram surtos de doenças transmitidas por alimentos. Dentre os alimentos envolvidos estão ovos, doces e sobremesas, água, carne bovina, leites e carne de frango sendo *Salmonella* o principal micro-organismo envolvido, representando 39,39% dos casos (SVS, 2013).

Um surto envolvendo *Salmonella bredeney* afetou 561 funcionários de uma indústria localizada em Araraquara, SP. O micro-organismo foi detectado a partir de exames de coprocultura realizados nos doentes, sugerindo que possivelmente eles

tenham ingerido alimentos contaminados durante a refeição do almoço (LANDGRAF, et al., 1985).

Em uma escola de Pontalinda, cidade localizada no Estado de São Paulo, 211 pessoas, dentre elas alunos e funcionários, passaram mal após a ingestão de patê elaborado com ovos e batatas. As análises apontaram para a presença de *Salmonella enteritidis* na concentração de 10^5 UFC/g do produto (KAKU et al., 1995).

SHIONARA et al. (2008), atentam para o fato de que muitos casos de gastroenterite não necessitam de hospitalizações e por este motivo o alimento responsável pela enfermidade não é investigado. Portanto, os casos totais de salmonelose em humanos, bem como as demais doenças transmitidas por alimentos, é subestimada.

A Resolução RDC nº 12 de 2001 (BRASIL, 2001) que estabelece os padrões microbiológicos em alimentos no Brasil, determina a ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra. Alimentos como carnes resfriadas ou congeladas, ovos, leite e derivados, frutas, alimentos prontos para consumo são exemplos de produtos que devem apresentar ausência desse micro-organismo.

2.2 Métodos para Detecção de *Salmonella* spp.

2.2.1 Método MAPA

Segundo Borowsky (2005), o método convencional para detecção de *Salmonella* spp. pode ser dividido em 6 fases: pré-enriquecimento não seletivo (objetiva a recuperação e multiplicação das células bacterianas, incluindo as lesadas); enriquecimento seletivo (nessa fase ocorre a inibição de micro-organismos competidores, permitindo assim o crescimento preferencial da *Salmonella* spp.); semeadura em meio sólido seletivo (além de inibir micro-organismos competidores que por ventura não tenham sido inibidos na fase anterior, a semeadura em meio sólido seletivo permite a diferenciação da *Salmonella* spp. da microbiota acompanhante); triagem bioquímica (realizada em colônias suspeitas de *Salmonella* spp.); confirmação bioquímica (a partir das colônias obtidas na triagem bioquímica, são realizadas provas bioquímicas adicionais) e a sorologia (se os testes feitos na fase de triagem bioquímica e confirmação bioquímica forem indicativos de

Salmonella spp. então é realizada a confirmação sorológica). No Brasil, este método é conhecido como oficial e preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2003).

Um dos maiores problemas do método oficial para análise de *Salmonella* spp. está na demora pelo resultado final que pode levar até sete dias para ser concluído. Outro empecilho está na necessidade de um grande número de reagentes e vidrarias (DICKEL, 2004). Por isso, a técnica oficial muitas vezes dificulta o monitoramento de contaminação e impossibilita que as ações sejam tomadas rapidamente (VON RUCKERT, 2006 citado por GOUVÊA, 2009).

2.2.2 Método Semissólido Rappaport Vassiliadis – MSRV

Outro método bastante difundido no Brasil opcional ao método oficial é a técnica do MSRV estabelecida no anexo da ISO 6579 (ISO, 2002). Nesse procedimento, utiliza-se o Ágar Semissólido - *Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis* (MSRV) que permite detectar os sorotipos de *Salmonella* spp. que possuem flagelos (FRANCHIN, 2008 e SOARES et al., 2010).

Vários estudos já comprovaram a eficácia desse método em vários produtos. Worcman-Barninka, et al. (2001), analisaram coxas de frango, linguças frescas, chocolate granulado e coco ralado fresco utilizando os métodos preconizados pelo anexo da ISO e pelo Ministério da Agricultura. Embora não tenham encontrado *Salmonella* spp. em amostras de chocolate granulado e coco ralado fresco, em coxas de frango e linguças frescas a detecção de *Salmonella* spp. foi equivalente em ambos os métodos.

Quanto a incubação do ágar, o método descreve que seja realizada durante 24 ± 3 horas a $41,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ incubando-se novamente por mais 24 ± 3 horas as amostras aparentemente negativas. Um estudo realizado em 1995 observou maior número de amostras falso positivas quando o meio foi incubado por 48 horas (DUSCH e ALTWEGG, 1995). Em contrapartida, alguns estudos em alimentos e em fezes de aves observaram resultados mais confiáveis quando a leitura se fez em 48 horas (WORCMAN-BARNINKA et al., 2001; CARRIQUE-MAS et al., 2009, ERIKSSON e ASPAN, 2007).

2.2.3 Meios de Cultura Utilizados nos Métodos MAPA e MSRV

2.2.3.1 Pré-Enriquecimento não Seletivo

A fase de pré-enriquecimento não seletivo é a primeira etapa na análise de *Salmonella* spp. para os dois métodos (descritos neste trabalho como Oficial e MSRV). Nessa fase se utiliza água peptonada tamponada juntamente com a amostra a ser avaliada, a qual é homogeneizada e incubada em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas. Objetiva restaurar e facilitar o crescimento de células injuriadas. Normalmente é utilizado água peptonada tamponada na concentração de 1% mas também podem ser empregados Caldo Lactosado, Triptona de Soja e Nutriente (LÁZARO et al., 2008).

2.2.3.2 Enriquecimento Seletivo

O enriquecimento seletivo tem o objetivo de manter a fase de crescimento da *Salmonella* spp. e dificultar o crescimento de outras bactérias através de agentes contidos nos meios. Existe uma variedade de caldos com esse propósito, porém, os recomendados pelo Método Oficial são o Caldo Rappaport Vassiliadis, Selenito Cistina e Tetrationsato. É nessa etapa que os métodos se diferenciam. Diferentemente do Método Oficial, o Método MSRV utiliza o Ágar Semissólido Rappaport Vassiliadis como meio de enriquecimento seletivo e de isolamento (LÁZARO et al., 2008).

O Caldo Rappaport Vassiliadis (Figura 1) é composto por peptona de soja, cloreto de sódio, fosfato de potássio monobásico, cloreto de magnésio e verde malaquita. O verde malaquita e o cloreto de magnésio atuam inibindo o crescimento de bactérias competidoras enquanto que a peptona de soja estimula o crescimento de *Salmonella* spp. (Brasil, 2003).

O Caldo Selenito Cistina (Figura 1) tem em sua composição as substâncias peptona de caseína, L (-) cistina, lactose, fosfato de sódio dibásico e bi-selenito de sódio. Esse caldo é o mais apropriado para amostras de origem fecal pois o selenito de sódio tem a capacidade de inibir *Coliformes* e *Enterococos*. A L(-)cistina melhora

a qualidade do meio estimulando o crescimento de *Salmonella* spp. (Brasil, 2003; LÁZARO et al., 2008).

O Caldo Tetrationato (Figura 1) pode ser utilizado adicionalmente segundo o Método Oficial (Brasil, 2003). O caldo é composto por peptona de caseína, peptona de carne, mistura de sais biliares, carbonato de cálcio e tiosulfato de sódio. Com exceção dos sorovares *choleraesuis*, *typhisuis*, *gallinarum* e *pullorum*, *Salmonella* possui a enzima tetrationato-redutase e com isso consegue se multiplicar. O inconveniente é que algumas bactérias como *Proteus* spp., também produzem essa enzima, multiplicam-se no meio e podem atuar como inibidores de *Salmonella* spp. Por isso, a substância verde brilhante deve ser adicionada ao caldo, afim de inibir o crescimento de *Proteus* spp. (LÁZARO et al., 2003).

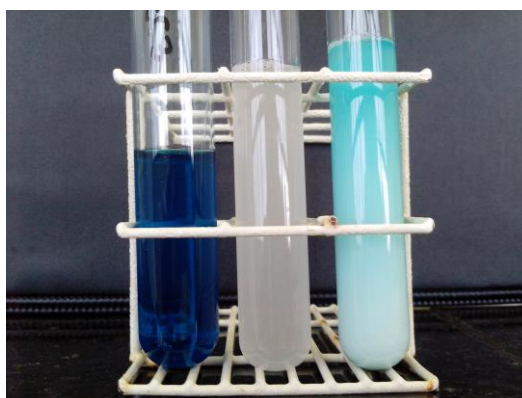


Figura 1 - Caldos de Enriquecimento Seletivo para após inoculação das amostras. (Esq. para Dir.) - Rappaport Vassiliadis, Selenito Cistina, Tetrationato. Fonte: A Autora.

O Meio *Semissólido Rappaport-Vassiliadis* (Figuras 2 e 3) é utilizado somente no Método MSRV descrito por ISO (2002). É composto por enzima digestiva, cloreto de sódio, caseína ácida hidrolisada, cloreto de magnésio e oxalato de verde malaquita, hígrogenofosfato de potássio e ágar. Destina-se à detecção de *Salmonella* móvel não sendo adequado para a detecção de sorotipos não-móveis (sorovares *gallinarum* e *pullorum*). Através dos flagelos, *Salmonella* spp. móvel consegue movimentar-se no ágar semissólido que pode ser percebido pelo aparecimento de um grande halo esbranquiçado formado ao redor do inóculo. Ao meio é adicionado o antibiótico novobiocina na concentração de 20mg/L afim de inibir micro-organismos competidores.

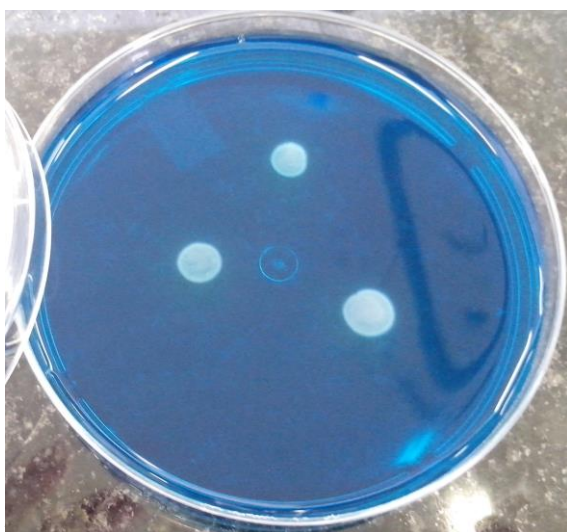


Figura 2 – Ágar Semissólido Rappaport-Vassiliadis após 24 horas de incubação, negativo para a presença de *Salmonella* spp.
Fonte: A Autora.



Figura 3 – Ágar Semissólido Rappaport-Vassiliadis após 24 horas de incubação, suspeito para a presença de *Salmonella* spp.
Fonte: A Autora.

Os meios de cultura utilizados nessa etapa tem a função de diferenciar *Salmonella* spp. de outras espécies que por ventura tenham se desenvolvido da fase de enriquecimento seletivo. O princípio básico dos meios está em suas propriedades inibitórias e no aspecto macroscópico das colônias (LÁZARO et al., 2008).

O Método MAPA para análise de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2003) solicita que todas as amostras sejam repicadas para dois meios sólidos, sendo que um deles obrigatoriamente deverá ser o Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose, conhecido como BPLS, que deverá ser acrescido do antibiótico novobiocina. O segundo meio poderá ser escolhido pelo laboratório que a análise está sendo executada, dentre eles citam-se o MLCB, Rambach, XLD ou XLT4. O Método MSRV (ISO, 2002) sugere que apenas as colônias crescidas e características no Ágar Semissólido Rappaport-Vassiliadis sejam repicadas para Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e outro opcional, de escolha do laboratório. Por essa característica, o Método MSRV se destaca em relação ao Método MAPA pois enquanto que no segundo método citado todas as amostras devem ser repicadas para dois ágar seletivos, o primeiro sugere que apenas colônias suspeitas na fase de enriquecimento seletivo sejam repicadas para apenas ágar seletivo.

O Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose, conhecido como BPLS, é composto por peptona de carne, peptona de caseína, extrato de

levedura, lactose, sacarose, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico, bile bovina, verde brilhante, vermelho de fenol e ágar. A bile bovina e o verde brilhante tem a função de inibir micro-organismos Gram-positivos. Ao ágar, deverá ser acrescido 40mg/L do antibiótico novobiocina que tem a função principal de inibir o crescimento de *Proteus* spp. (BRASIL, 2003).

O Ágar MCLB tem em sua formulação extrato de levedura, peptona, extrato de carne, cloreto de sódio, manitol, L-lisina cloridrato, tiosulfato de sódio, citrato de ferro e amônio, verde brilhante, cristal violeta e ágar. A principal função do ágar é detectar cepas de comportamento atípico do Ágar BPLS e, associado ao Caldo de Enriquecimento Seletivo Rappaport Vassiliadis, tem sua capacidade aumentada (LÁZARO et al., 2008; BRASIL, 2003).

O Ágar Rambach é composto por peptona, cloreto de sódio, desoxicolato de sódio, mistura cromógena, propilenoglicol e ágar. O composto cromogênico sugere a presença de β -galactosidase, indicador dos coliformes, evidenciada pelo desenvolvimento de colônias azul-esverdeadas ou violeta-azuladas no meio. A identificação de *Salmonella* spp. é evidenciada a partir da coloração vermelho carmim das colônias, propiciada pela substância propilenoglicol (LÁZARO et al., 2008; BRASIL, 2003).

O Ágar XLD, recomendado como meio obrigatório para seleção de *Salmonella* spp. no Método MSRV, pode ser utilizado como opcional no Método Oficial. É composto por extrato de levedura, L(+)lisina, lactose, D(+)xilose, sacarose, cloreto de sódio, desoxicolato de sódio, vermelho de fenol, tiosulfato de sódio, ágar, citrato de amônio e ferro III. É considerado como um meio seletivo e de diferenciação. O extrato de levedura atua como fonte de vitaminas e nutrientes enquanto que o desoxicolato de sódio inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas. A xilose é fermentada por quase todos os micro-organismos que pertencem a família da *Enterobactérias*. A lisina atua na identificação da *Salmonella* spp. pois após esgotar a fonte de xilose esse micro-organismo passa a fermentar a lisina e, então, a enzima lisina descarboxilase reverte o meio a um pH alcalino, tornando possível sua identificação. A coloração negra das colônias características de *Salmonella* spp. são formadas através do composto formado por tiosulfato de sódio e citrato de amônia e ferro III, o qual atuam como indicador de ácido sulfídrico (H_2S) (BRASIL, 2003; BD, 2013).

O ágar XLT4, conhecido como Xilose Lisina Tergitol 4, é composto por extrato de levedura, proteose peptona, L-lisina, lactose, D-xilose, sacarose, cloreto de sódio, vermelho de fenol, tiosulfato de sódio, ágar, citrato de amônio e ferro III. O tergitol 4 tem a capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos competidores como *Proteus* spp. e *Pseudomonas* spp. diminuindo resultados falsos-negativos e permitindo o crescimento de *Salmonella* spp. *Salmonella* spp. é detectada no meio de cultura através da produção de ácido sulfídrico (H₂S) que se forma pela degradação do tiosulfato de sódio ao reagir com íons férricos formando colônias negras. Ao degradar a lisina, *Salmonella* spp. provoca a elevação do pH do meio e a viragem do indicador de vermelho de fenol proporciona colônias com halo na cor violeta (BRASIL, 2003; MÜLLER, 2005).

2.2.3.4 Identificação Bioquímica – Meios de Triagem

Após o isolamento de colônias características nos meios sólidos as colônias suspeitas passam por provas bioquímicas para confirmação de *Salmonella* spp. O Método Oficial sugere que sejam observadas a ausência de citocromo oxidase, detecção de pirrolidonil peptidase, produção de uréase, detecção de beta-galactosidase; descarboxilação da lisina; produção de ácido sulfídrico (H₂S), motilidade, produção de indol, fermentação da glicose, sacarose e lactose. O Método MSRV recomenda que sejam realizadas provas bioquímicas que identifiquem a fermentação da glicose, sacarose e lactose, produção de uréase, ausência de β –galactosidase, ausência de ácido pirúvico e ausência de indol (ISO, 2002; BRASIL, 2003).

A prova bioquímica capaz de identificar a produção ou não de citocromo oxidase é chamada de prova oxidase. Consiste em transferir as colônias suspeitas para uma superfície de papel, como papel filtro, e em seguida adicionam-se reagentes com reativos corantes como o dicloridrato de p-fenilenodiamina ou oxalato de p-amino-dimetil-anilina. Na presença de citocromo oxidase os reagentes formam um produto de tonalidade azul ou rosa e, se não houver produção da substância, a reação não tem sua coloração alterada. Esse teste serve para diferenciar membros da Família *Enterobacteriaceae* (que geralmente são negativas para o teste como

Salmonella spp. e *Escherichia coli*) de outros micro-organismos como *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp. (BRASIL, 2003; LÁZARO et al., 2008).

A detecção da enzima pirrolidonil peptidase (PYRase) tem o objetivo básico de diferenciar *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (não produtoras da enzima) de *Citrobacter* spp. (produtor da enzima). A cultura suspeita deve ser colocada em um cartão de papel impregnado com ácido L-pirotglutâmico e sem seguida deverão ser adicionadas gotas do reagente para-dimetilaminocinamaldeído. O substrato será hidrolisado pela PYRase e, pela ação do reagente, desenvolverá coloração vermelha. Vale ressaltar que 96% dos sorotipos de *Salmonella* spp. não produzem a enzima PYRase (LÁZARO et al., 2008).

A produção de uréase é observada através do meio ureia (caldo ou ágar). Esse meio é composto por extrato de levedura, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio bibásico, ureia e vermelho de fenol. Se a cultura suspeita, ao ser inoculada no meio, provocar a alteração de cor, significa que possui a enzima uréase e conseqüentemente ocorre hidrólise da uréia. Como ocorre a alteração de pH, o vermelho de fenol atua acentuando a coloração para rosa intenso. *Salmonella* spp. não possui a enzima uréase e, portanto, não degrada o meio que permanece com a coloração inalterada (ISO, 2002; BRASIL, 2003; MÜLLER, 2005; LÁZARO et al., 2008).

A detecção da enzima beta-galactosidase é verificada através da utilização do composto orgânico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, conhecido como ONPG. Os micro-organismos que possuem a enzima alteram a coloração do composto para amarelo ouro. *Salmonella* spp. não altera a coloração do composto pois não produzem a enzima beta-galactosidase (MÜLLER, 2005).

A descarboxilação da lisina pode ser observada através no Caldo Lisina ou do Ágar LIA (Ágar Lisina Ferro). O Ágar LIA, comumente utilizado, é composto por peptona de carne, extrato de levedura, L-lisina, glicose, citrato férrico amoniacal, tiosulfato de sódio, púrpura de bromocresol e ágar. As reações no ágar começam a partir da fermentação da glicose que deixa o meio ácido, ocorre a viragem do indicador púrpura de bromocresol resultando em coloração amarela. Posteriormente, a enzima lisina descarboxilase, presente em alguns micro-organismos, começa a descarboxilar a lisina. Essa reação resulta na produção de cadaverina e CO₂, alcaliniza o meio de cultura e novamente ocorre a viragem da cor do indicador, de

amarelo para púrpura-azulada. No Ágar LIA ainda é possível observar a produção de ácido sulfídrico (H_2S) através do escurecimento do meio. *Salmonella* spp. produz a enzima lisina descarboxilase, ácido sulfídrico e é capaz de fermentar glicose (BRASIL, 2003; MÜLLER, 2005).

A produção de ácido sulfídrico (H_2S) pode ser observada a partir das provas bioquímicas utilizando os Ágares LIA (Ágar Lisina Ferro), TSI (Ágar Tríplice Açúcar Ferro) e SIM. De maneira geral, os micro-organismos inoculados nos ágares acima citados produzem ácido sulfídrico ao reduzir tiosulfato de sódio. Forma-se então um gás incolor que reage com componentes do meio como citrato de ferro, deixando o meio enegrecido. Cerca de 15% dos sorotipos de *Salmonella* spp. não produzem H_2S (BRASIL, 2003; MÜLLER, 2005).

A motilidade e produção de indol podem ser observadas a partir do Ágar SIM, composto por peptona de caseína, peptona de carne, citrato de amônio e ferro III, tiosulfato de sódio e ágar. A motilidade caracteriza-se pelo crescimento do micro-organismo em todo o meio, enquanto a imobilidade é observada se o crescimento for restrito à linha de semeadura. Apenas *Salmonella gallinarum* e *Salmonella pullorum* não apresentam motilidade pois não possuem flagelos. Após ser feita a leitura da motilidade, é adicionado ao meio gotas do reativo de Kovac's. A produção de um anel vermelho indica a produção de indol, não sendo característico para *Salmonella* spp. Essa reação ocorre quando os micro-organismos oxidam o triptofano presente no meio resultando nos compostos indol, escatol e indolacetato. Ao adicionar no meio gotas do reativo de Kovac's a dimetilaminobenzaldeído presente reage com indol formando então um anel vermelho (BRASIL, 2003).

A fermentação da glicose, sacarose e lactose podem ser percebidas através do Ágar TSI (Ágar Tríplice Açúcar Ferro) que é composto por extrato de carne, extrato de levedura, peptona de caseína, lactose, sacarose, D(+)glicose, citrato de amônio e ferro, cloreto de sódio, tiosulfato de sódio, vermelho de fenol e ágar. Esse ágar deve ser preparado em tubos para que a fermentação anaeróbica e aeróbica seja observada. Quando é fermentada de forma anaeróbica o meio se torna ácido, reação pode ser percebida no fundo do tubo de ensaio através da viragem do indicador vermelho de fenol que faz com que o meio fique amarelo. Quando a glicose é fermentada de maneira aeróbica, na parte superior do tubo, ocorre a formação de ácido pirúvico que é degradado a CO_2 e água. Essa reação não

provoca alteração do pH do meio, portanto não há mudança de coloração. Se ocorrer a fermentação da sacarose e da lactose, ocorre acidificação do pH e consequentemente a mudança da coloração do meio para amarelo. A produção de ácido sulfídrico, característico da *Salmonella* spp. pode ser observada a partir da formação de precipitado preto. A grande maioria da *Salmonella* spp. fermenta a glicose e não fermenta sacarose e lactose e, portanto, a coloração avermelhada do ágar deve manter-se ao longo do tubo, com exceção da base que poderá ser amarela devido a fermentação anaeróbica da glicose. O meio poderá se apresentar parcialmente ou totalmente negro (BRASIL, 2003; MÜLLER, 2005; LÁZARO et al., 2008).

2.2.3.5 Confirmação Sorológica

Após a identificação da *Salmonella* spp. na etapa de identificação bioquímica, são realizados testes de confirmação sorológica baseado em reações antígeno-anticorpo (TOZETTO, 2006). A técnica tradicionalmente utilizada é a sorotipagem onde anticorpos específicos são utilizado afim de identificar as estruturas antigênicas que estão presentes na superfície da célula como os antígenos somáticos “O”, antígenos flagelares “H” e antígenos capsulares “Vi” (SILVA et al., 2010).

Os antígenos somáticos “O” são comuns a várias espécies de *Salmonella* spp. e encontram-se na extremidade da parede celular, mais especificamente nos lipopolissacarídeos, os antígenos flagelares estão presentes nos flagelos das espécies móveis de *Salmonella* spp. e os antígenos capsulares são encontrados apenas nas espécies de *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi C* e ocasionalmente pode estar presente na *Salmonella Dublin* (SILVA et al., 2010; FERREIRA e CAMPOS, 2008).

2.2.4 Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification - LAMP

Em busca de maior eficiência nas análises que objetivam a detecção de patógenos e outros micro-organismos, muitas técnicas baseadas na identificação de DNA vem sendo desenvolvidas e modificadas.

A reação em cadeia da polimerase ou *polymerase chain reaction* – PCR, foi descrita em 1986 pelo pesquisador Kary Mullis e consiste em uma síntese através de ciclos repetidos utilizando oligo-nucleotídeos de DNA para replicar sequências definidas, formando assim a base para a amplificação e detecção de sequências de ácido nucléico peculiares. Através da detecção do DNA do micro-organismo alvo, o método PCR pode ser considerado como uma técnica de alta sensibilidade e especificidade (MULLIS et al., 1986; PERSING, 1991; GOUVÊA, 2009).

No entanto, enfatiza-se que essa técnica requer colaboradores especializados, materiais e equipamentos específicos e de custo elevado o que a limita a laboratórios que tem boa disponibilidade de recursos financeiros. Na tentativa de redução de tempo e custos, técnicas semelhantes a PCR vem sendo desenvolvidas como a *Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification* – LAMP (SANTOS, 2011).

O Método LAMP foi desenvolvido por Notomi et al. (2000) e tem como principal característica a sua capacidade de amplificar o ácido nucléico em condições isotérmicas, a aproximadamente 60°C. Essa característica reduz o trabalho laboratorial além de serem utilizados equipamentos mais simples e de menor custo quando comparado a técnica PCR. A técnica também permite a detecção de um tipo específico de DNA mesmo que estejam presentes moléculas de DNA não alvo. (CHIARI, 2010).

Em abril de 2012, a AOAC aprovou uma técnica de detecção de micro-organismos incluindo *Salmonella* spp. da empresa 3M *Food Safety*. O método chamado de 3M MDS® é baseado na técnica LAMP e consegue identificar o micro-organismo alvo através da amplificação isotérmica de DNA com detecção por bioluminescência. A técnica garante a precisão dos resultados e a otimização de tempo e espaço (Santos, 2013).

O método consiste em quatro etapas básicas: enriquecimento da amostra que visa a recuperação de células que por ventura estejam injuriadas, desnaturação do DNA com posterior rompimento, ligação das fitas de DNA com primers conhecidos (etapa de amplificação) e leitura dos resultados.

A recuperação de células injuriadas é realizada incubando-se 25 gramas de amostra com 225mL de água peptonada tamponada em estufa a 37 °C ± 1°C por 18

a 24 horas, procedimento comum ao Métodos MSRV e Oficial, diferindo-se apenas na temperatura e tempo de incubação (AOAC, 2012).

A desnaturação do DNA visa o rompimento das pontes de hidrogênio que ligam as fitas sequenciais, chamada de etapa de “lising”. A desnaturação ocorre devido a temperatura alta de 100°C que a amostra é submetida durante 15 minutos. Em seguida, afim de promover a maior sensibilidade da reação, a amostra é submetida a uma temperatura de -10°C durante 10 minutos. Se esse último processo não for realizado, ou não feito de maneira inadequada, o DNA desnaturado poderá se renaturar voltando a formação original da molécula (DE ROBERTIS e HIB., 2014; SANTOS, 2013).

Na etapa de amplificação do DNA que ocorre em 75 minutos, as fitas rompidas se unem a primers reconhecidos específicos. Os primers são estruturas sequenciais de bases nitrogenadas que iniciam as replicações se o DNA desnaturado for compatível. No caso de compatibilidade, os primers se colocam em posições específicas do genoma com a ajuda da Enzima DNA Polimerase Isotermal (que atua a uma temperatura constante de 60°C) promovendo a amplificação do DNA alvo. A enzima DNA Polimerase Isotermal tem um papel importante nessa etapa promovendo a identificação e amplificação do DNA alvo. Não havendo a compatibilidade do DNA rompido com os primers, não há ligação e amplificação e a análise é considerada negativa. Conforme a reação de amplificação do DNA vai ocorrendo, um subproduto é formado – o Pirofosfato. O Pirofosfato é convertido em Adenina Trifosfato (APT) através da reação enzimática entre a ATP Sulfurilase e Adenosina Fosfossulfato (molécula precursora do ATP). A APT produzida reage com o substrato Luciferina presente no meio e através da enzima Luciferase ocorre a catalização da reação resultando em produção de luz (SANTOS, 2013).

A luz que é produzida pela reação é quantificada em RLU (Unidade Relativa de Luz) através de um software desenvolvido especialmente para o método. Um gráfico é gerado e conforme a luz é sendo mensurada, picos vão indicando a presença do micro-organismo na amostra. Esses picos que indicam positividade da reação são revelados a partir dos primeiros 15 minutos (Figura 4), porém, os resultados finais são dados decorridos 75 minutos (Figura 5) (SANTOS, 2013).

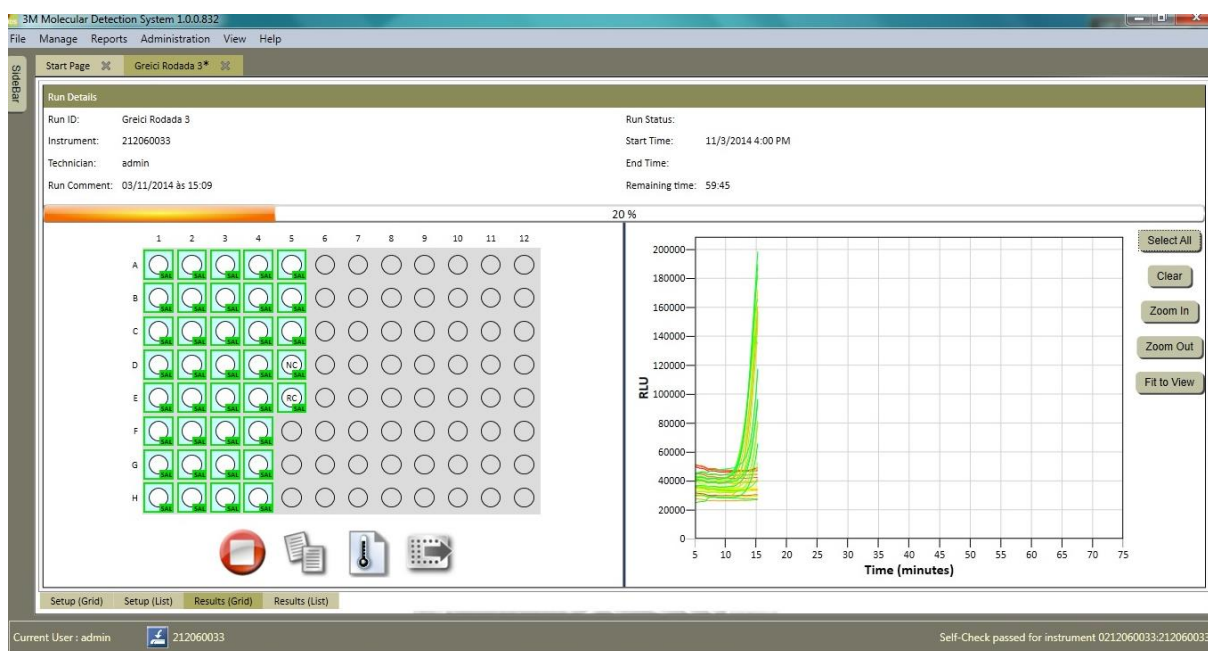


Figura 4 – Software do sistema de detecção de patógenos 3M MDS[®] após 15 minutos de análise.
Fonte: A Autora.

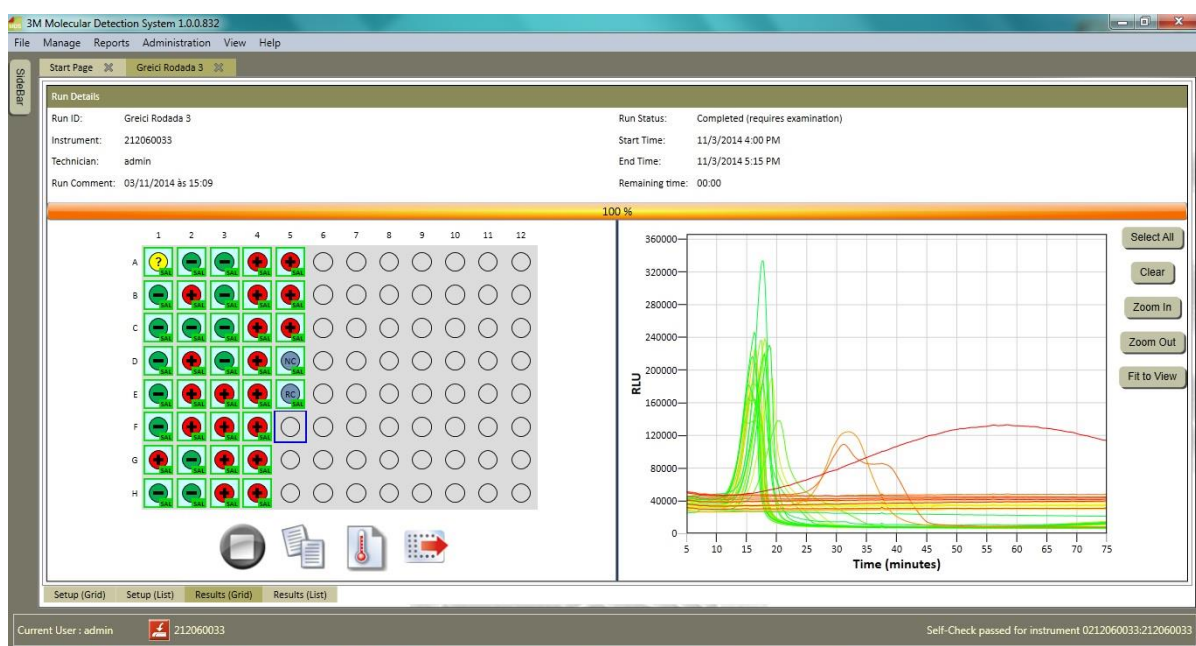


Figura 5 – Software do sistema de detecção de patógenos 3M MDS[®] após 75 minutos de análise.
Fonte: A Autora.

Bird et al. (2013), reuniu estudos comparativos de 20 laboratórios nos Estados Unidos. Ao total, foram analisadas 1.516 amostras sendo 81 de carne moída crua e 4.840 de alimento para cachorro elaborado com carne em molho. As amostras de carne moída foram contaminadas artificialmente com *Salmonella ohio* e o alimento para cachorro com *Salmonella poona* em concentrações de 2-5

UFC/Amostra, 0,2-2 UFC/Amostra e amostras controles sem adição de inóculo. Os ensaios foram realizados pelos métodos descritos por FDA (2011), que utiliza Caldo Lactosado no enriquecimento das amostras e os caldos Rappaport Vassiliads e Tetrationato como meios de seleção; USDA (2001), que utiliza Água Peptonada Tamponada como meio de enriquecimento e os caldos Rappaport Vassiliads e Tetrationato Hajna como meios de seleção; e AOAC (2012) que vale-se de princípios de detecção de DNA para detecção do micro-organismo alvo chamado 3M MDS®. Os resultados obtidos mostraram não haver diferenças significativas entre os três métodos avaliados.

Dentre os métodos analíticos oficiais reconhecidos principalmente no Brasil, as técnicas tradicionais de análise de micro-organismos em alimentos ainda continuam sendo as mais utilizadas. Entretanto, no futuro, as necessidades farão com que métodos moleculares de análise sejam alternativas viáveis, confiáveis e fundamentais (GANDRA et al., 2008). Por isso, torna-se extremamente importante que pesquisas comparativas sejam desenvolvidas para atestar a eficiência dessas novas técnicas, beneficiando assim tanto a indústria alimentícia, que conseguirá liberar o produto em um curto espaço de tempo, quanto o consumidor, que poderá ter a certeza de adquirir um alimento seguro.

2.3 Resistência Antimicrobiana

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos e tem a função de inibir o crescimento (substâncias bacteriostáticas) ou eliminar as bactérias (substâncias bactericidas). A partir do descobrimento dessas substâncias, houve uma grande redução na mortalidade causada por doenças infecciosas em humanos e animais (GUIMARÃES et al., 2010; MOTA et al., 2005).

A grande maioria dos antibióticos de uso clínico são de origem natural e semi-sintéticos sendo classificados nos grupos β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos, estreptograminas, sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES et al., 2010).

A resistência microbiana pode ser definida como a capacidade que um micro-organismo tem em continuar a se multiplicar ou se manter ativo mesmo na presença de princípios ativos antimicrobianos específicos e vem sendo amplamente

estudada em vários gêneros bacterianos principalmente entre aqueles que são responsáveis doenças. É classificada como natural, quando a resistência é característica da espécie; ou adquirida, quando o micro-organismo de determinada espécie normalmente é sensível a um antimicrobiano e com o passar do tempo torna-se resistente a droga (GUIMARÃES et al., 2010; ANVISA, 2008; MANTILLA et al., 2008; VIGNOLI e SEIJA, 2008).

No caso de micro-organismos Gram negativos como *Salmonella* spp., a parede celular apresenta estrutura mais complexa quando comparado com bactérias Gram positivas e por essa razão são naturalmente mais resistentes à ação de substâncias antimicrobianas (GUIMARÃES et al., 2010)

Até o início do século XXI a resistência bacteriana era restrita a ambientes hospitalares e com o passar dos anos micro-organismos resistentes passaram a serem isolados no meio ambiente representando riscos à saúde humana e animal. O aumento da resistência bacteriana a agentes antimicrobianos tem sido associada a sua utilização inapropriada e excessiva em humanos e animais ao longo dos anos, as más condições de higiene, ao fluxo intenso de viajantes, ao aumento de pacientes imunocomprometidos e a demora no diagnóstico de doenças causadas por bactérias (OMS, 2012; GUIMARÃES et al., 2010; MOTA et al., 2005).

Cortez et al. (2006), obtiveram 29 isolados de *Salmonella* spp. em uma linha de abate de aves e a análise de resistência antimicrobiana revelou que 93,1% delas eram resistentes a amicacina, 86,2% a ampicilina, 75,9% a cefalotina e 72,4% a cefotaxima. Quanto à sensibilidade, a droga com maior eficiência foi a gentamicina onde 96,5% dos isolados mostraram-se susceptíveis, seguido da tobramicina com 68,97% de eficácia.

Spricigo et al. (2008) avaliaram o perfil de resistência a agentes antimicrobianos em 60 isolados de *Salmonella* spp. obtidos a partir de linguiça frescal suína comercializadas na Cidade de Lages, Santa Catarina. Foi observada resistência bacteriana em 56,7% das amostras e em 20% delas foi verificada multirresistência a antibióticos. Os antibióticos que apresentaram menor eficiência foram ácido nalidíxico, sulfonamida e tetraciclina. Nenhuma amostra foi resistente a amoxicilina mais ácido clavulânico, cefaclor, neomicina, tobramicina e gentamicina.

Dias et al. (2008) avaliaram seis isolados de *Salmonella* spp. provenientes de amostras de carne moída bovina, linguiça frescal suína e de frango

comercializados no sul do Brasil. Metade dos isolados foram resistentes à tetraciclina e ao cloranfenicol e todos foram sensíveis a ampicilina.

Souza et al. (2010), avaliaram a resistência antimicrobiana em 44 isolados de *Salmonella typhi* provenientes de pacientes sintomáticos da doença. Os autores observaram que as cepas apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos ampicilina, amoxicilina mais ácido clavulânico, ceftazidima, gentamicina e sulfametoxazol mais trimetopim. A resistência aos antimicrobianos ocorreu em 15,9% dos isolados para a nitrofurantoína e em 2,28% para cloranfenicol, ácido nalidíxico e tetraciclina.

2.4 Capacidade de Formação de Biofilme

Algumas bactérias, devido suas características biológicas, possuem maior facilidade em se aderir a superfícies compactas formando grandes comunidades, chamadas de biofilmes. Ao fazer parte da estrutura de um biofilme, as bactérias tornam-se mais tolerantes ao estresse e passam a ter uma maior resistência a antibióticos e desinfetantes, o que dificulta a sua eliminação. Existe ainda a preocupação do biofilme atuar como um substrato, atraindo bactérias que normalmente não teriam a capacidade de formar biofilme (LAPIDOT, ROMLING e YARON, 2006; OLIVEIRA, 2011).

A adesão bacteriana pode ocorrer tanto em superfícies abióticas (inanimadas) como em superfícies bióticas (células e tecidos de animais ou vegetais). Esse processo é dividido em duas fases: a primeira, conhecida como adesão primária, é reversível e ocorre através de interações físico-químicas entre as bactérias e a superfície de contato; a segunda, adesão secundária, é irreversível e é caracterizada por um processo em que os micro-organismos que encontram-se fracamente ligados a superfície consolidam o processo de adesão ligando-se a células de espécies diferentes, formando aglomerados rigidamente ligados a superfície (TRENTIN et al., 2013).

Uma das principais causas do processo de formação do biofilme em ambientes de produção de alimentos é a má higienização dos equipamentos e superfícies pois os resíduos acumulados servem de substrato às bactérias que se alojam no local e iniciam o processam de multiplicação celular. A adesão bacteriana

é facilitada quanto a superfície é porosa, áspera ou hidrofóbica (OLIVEIRA et al. 2006; JESSEN e LAMMERT, 2003; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

Por possuírem fímbrias, *Salmonella* spp. consegue se aderir mais facilmente as superfícies e colonizar o local. Esse micro-organismo, em específico, consegue formar biofilmes em superfícies fabricadas em cimento, aço inoxidável, plástico, vidro e borracha (OLIVEIRA, 2011).

A formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos é preocupante pois os micro-organismos que se aderem as superfícies tornam-se mais resistentes a agentes antimicrobianos e a sanitizantes e a grande concentração de células aderidas aos equipamentos podem facilmente contaminar lotes inteiros de produtos (KASNOWSKI et al., 2010).

Pissolato et al. (2012), testaram a capacidade de formação de biofilme em superfícies constituídas de poliestireno de 15 amostras de isolados de *Salmonella enteritidis* provenientes de ambiente avícola. Os autores constataram que 75% delas eram fracamente formadoras de biofilmes, 15% moderadamente formadoras e apenas 1% fortemente formadoras. Os 9% restantes não tinham a capacidade de formar biofilmes.

Agostinetto et al. (2011), avaliaram três isolados de *Salmonella enteritidis*, provenientes de ambiente avícola, quanto a capacidade de formação de biofilme em superfícies de vidro, alumínio e polietileno. Os resultados demonstraram que todos os isolados conseguiram formar biofilme nas superfícies testadas.

3 PROJETO DE PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS - UFPEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



PROJETO DE QUALIFICAÇÃO DE MESTRADO

**Comparação de Métodos Fenotípicos e Molecular 3M MDS para Identificação
de *Salmonella* spp.**

Greici Bergamo

Pelotas, 2014

GREICI BERGAMO

**Comparação de Métodos Fenotípicos e Molecular 3M MDS para Identificação
de *Salmonella* spp.**

Projeto de Qualificação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos
da Universidade Federal de Pelotas.

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Co-orientadores: Prof. Dr. Cláudio Dias Timm

Prof^a. Dr^a. Elizabete Helbig

Pelotas, 2014

Banca Examinadora: Prof^a. Dr^a. Helenice Gonzalez de Lima (Membro Efetivo)
Prof^a. Dr^a. Kely Lameiro Rodrigues (Membro Suplente)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 <i>Salmonella</i> spp.: Características, Surtos, Contaminação e Legislação	13
2.2 Métodos para Detecção de <i>Salmonella</i> spp.	17
2.2.1 Método Oficial no Brasil.....	17
2.2.2 Método Sêmi-Sólido Rappaport Vassiliadis – MSRV	18
2.2.3 Detecção pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	46
3 HIPÓTESES.....	48
4 OBJETIVOS E METAS.....	49
4.1 Objetivo.....	49
4.1.1 Objetivos Específicos	11
4.2 Metas	49
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	51
5.1 Comparação entre os Métodos Oficial, MSRV E 3M MDS para detecção de <i>Salmonella</i> spp. em amostras de leite UHT contaminadas artificialmente	51
5.2 Comparação entre os Métodos Oficial, MSRV E 3M MDS para detecção de <i>Salmonella</i> spp. em amostras de produtos cárneos comercializadas em açougues da Cidade de Pelotas – RS	51
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
6.1 Comparação entre os Métodos Oficial, MSRV E 3M MDS para detecção de <i>Salmonella</i> spp. em amostras de leite UHT contaminadas artificialmente	53
6.1.1 Culturas Microbianas.....	53
6.1.2 Reativação de Culturas	53
6.1.3 Quantificação das Culturas	53
6.1.3.1 Construção de uma Curva Padrão correlacionando densidade ótica com concentração microbiana.	53
6.1.4 Amostras	54
6.1.5 Pré-Enriquecimento.....	54
6.2 Comparação entre os Métodos Oficial, MSRV E 3M MDS para Detecção de <i>Salmonella</i> spp. em Amostras de Produtos Cárneos Comercializadas em Açougues da Cidade de Pelotas – RS	55

6.2.1 Coleta e Preparo das Amostras.....	55
6.2.2 Etapa de Pré-Enriquecimento.....	55
6.3 Métodos	55
6.3.1 Método Preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – Oficial	56
6.3.1.1 Enriquecimento Seletivo	56
6.3.1.2 Isolamento e Seleção	56
6.3.1.3 Teste Sorológico - Aglutinação Rápida	57
6.3.2 Método Rappaport-Vassiliadis em ágar Semissólido modificado MSRV, Preconizado pela International Organization for Standardization – ISO.....	57
6.3.2.1 Isolamento e Seleção	57
6.3.2.2 Teste Sorológico - Aglutinação Rápida	58
6.3.3 Método 3M MDS (Molecular Detection System) Aprovado pela Association of Official Analytical Chemistry - AOAC.....	25
6.3.3.1 Isolamento, Seleção e Resultados	58
6.3.4 Avaliação Estatística	59
 7 RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS.....	60
 8 CRONOGRAMA DO PROJETO.....	30
 9 ORÇAMENTO	28
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 – DETECÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EM AMOSTRAS DE LEITE UHT CONTAMINADAS ARTIFICIALMENTE ATRAVÉS DOS MÉTODOS OFICIAL, MSRV E 3M MDS.....	51
Quadro 02 – DETECÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EM AMOSTRAS DE PRODUTOS CÁRNEOS ATRAVÉS DOS MÉTODOS OFICIAL, MSRV E 3M MDS	52
Quadro 03 – CRONOGRAMA DO PROJETO.....	30

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, o Brasil destaca-se como exportador de carne bovina e de aves. Para evitar perdas geradas por embargos econômicos impostos pelos países importadores, as unidades produtoras e exportadoras de alimentos estão estabelecendo medidas mais rígidas de produção visando um maior controle sanitário (BRASIL, 2005 citado por SHINOHARA, et al., 2008).

Um dos principais micro-organismos investigados em produtos alimentícios é *Salmonella* spp. A falta de higiene na preparação dos alimentos, bem como o processamento e a estocagem inadequada facilitam a multiplicação desse micro-organismo (BOROWSKY, 2005).

Salmonella spp. afeta indivíduos mais susceptíveis, principalmente idosos, crianças e imunodeprimidos, podendo causar doenças graves que necessitam de hospitalização e de um cuidado rigoroso, representando altos custos sociais e econômicos (PERESI, 1998).

Muitos países exigem a ausência desse micro-organismo como requisito mínimo para a importação de produtos alimentícios. A obtenção de dados confiáveis sobre a presença/ausência de *Salmonella* spp. em produtos avalizam a qualidade do alimento e ganham a confiança do consumidor (JAY, 1992 citado por BOROWSKY, 2005). Por isso, cabem as empresas do setor de alimentos e bebidas analisar insumos e produtos acabados através de métodos com elevada sensibilidade e especificidade de forma rápida e precisa, garantindo assim que os resultados sejam confiáveis e entregues em curto espaço de tempo.

Segundo Reis et al. (2002), os métodos para detecção de *Salmonella* spp. resumem-se as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos e identificação das colônias por meio de testes bioquímicos e sorológicos.

As várias etapas e o longo tempo para se obter uma resposta necessária nas técnicas convencionais fazem com que métodos utilizando novas técnicas para pesquisa de *Salmonella* spp. em alimentos venham sendo desenvolvidos, objetivando principalmente a diminuição do tempo de análise, a redução de trabalho laboratorial, o aumento da sensibilidade e a precisão dos resultados.

Métodos alternativos, utilizando meios de cultura diferenciais, atualmente são uma opção na tentativa de reduzir tempo, trabalho e custos. O método preconizado pela International Organization for Standardization – ISO (ISO, 2002) utiliza um meio semissólido, conhecido como MSRV – Meio Semissólido Rappaport Vassiliadis, com a finalidade de reduzir o tempo de análise em 24 horas em comparação ao método oficial brasileiro preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2003).

Técnicas moleculares para detecção de micro-organismos em alimentos também são alternativas para diminuir o tempo de resposta dos resultados. Alguns métodos permitem identificar o micro-organismo através da amplificação de ácidos nucléicos em amostras pré-enriquecidas e neste contexto está o 3M MDS da Empresa 3M *Food Safety*. O método permite identificar o micro-organismo alvo através da amplificação isotérmica de DNA com detecção por bioluminescência. A técnica garante a precisão dos resultados e a otimização de tempo e espaço podendo ser utilizado em alimentos e bebidas (REVISTA LATICÍNIOS, 2012).

Diante da necessidade de técnicas rápidas, sensíveis e precisas para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, o presente estudo pretende fazer uma comparação entre métodos convencionais fenotípicos comumente utilizados e o método 3M MDS para identificação deste micro-organismo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Salmonella* spp.: Características, Surtos, Contaminação e Legislação

O gênero *Salmonella* spp. pertence à família Enterobacteriaceae e é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* subdivide-se em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica* (MOREIRA, 2012). São bacilos Gram negativos, não formam esporos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. A temperatura ótima de crescimento varia entre 35°C a 43°C, mas podem crescer entre 5°C e 46°C. O pH de crescimento ótimo varia entre 7,0 a 7,5 e o valor mínimo de atividade de água para crescimento é de 0,94 (SILVA et al., 2007).

Esse micro-organismo habita principalmente o aparelho trato intestinal de humanos e animais, podendo se adaptar a vários tipos de hospedeiros. Porém, alguns sorotipos são restritos a um hospedeiro como a *S. Abortusovis* em ovinos, *S. Gallinarum* em aves, *S. Typhi*, *Paratyphi A* e *C* em humanos, e *S. Dublin* em bovinos (SILVA et al., 2010).

Salmonella spp. pode causar doenças em animais e em seres humanos por meio da ingestão de alimentos contaminados (PERESI, 1998) podendo ser fatal em crianças, adultos imunocomprometidos e idosos por apresentarem baixa resistência às infecções (PINTO et al., 2004). As espécies *S. Typhi* e *S. Paratyphi* provocam septicemia e febre tifoide ou paratifóide em humanos podendo lesionar vários órgãos (SILVA et al., 2010). No entanto, a maioria das espécies de *Salmonella* apresentam sintomas caracterizados por vômitos, náuseas, cefaléia, calafrios, diarreia e dores abdominais após 12 a 14 horas da ingestão do alimento contaminado. Normalmente o organismo consegue se recuperar naturalmente e, em casos de internações, a melhora dá-se em até quatro dias (JAY, 2005 citado por GOUVÊA, 2009). Os sorotipos mais comumente envolvidos na transmissão de salmonelose são as espécies *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (SILVA et al., 2010).

Embora o primeiro surto de salmonelose tenha sido descrito em 1888 na Alemanha, a frequência de casos começou a ser percebida a partir da década de 70 na Europa e nos Estados Unidos (SHINOHARA, 2008).

No ano de 2010, doze pessoas foram infectadas por *Salmonella* após ingestão de hambúrgueres produzidos com carne de peru. Os casos ocorreram em 10 estados norte americanos e envolveram a cepa *hadar*, resistente a muitos antibióticos (CDC, 2011).

Em 2012, 46 pessoas apresentaram sintomas relacionados a salmonelose após o consumo de carne moída bovina contaminada com *Salmonella enteritidis* e 12 pacientes precisaram de cuidados hospitalares. O surto ocorreu em 9 estados nos Estados Unidos e o Departamento de Agricultura norte americano fez recall do lote suspeito (CDC, 2012). Também envolvendo carne moída, 22 pessoas ficaram enfermas após o consumo do produto contaminado com *Salmonella typhimurium* nos Estados Unidos, em 2013 (CDC, 2013a).

Após o consumo de sushis, 116 pessoas passaram mal e 12 precisaram de cuidados hospitalares nos Estados Unidos. O atum utilizado para a preparação do alimento estava contaminado com *Salmonella bareilly*. Os relatos ocorreram em 20 estados e o produto foi recolhido dos locais de comercialização (FDA, 2012).

Em outubro de 2013, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos registrou um surto envolvendo carne de frango contaminada com *Salmonella heidelberg*, onde aproximadamente 278 pessoas foram afetadas em 18 estados norte americanos (USDA, 2013). Outro surto também registrado em 2013 resultou em 16 pessoas infectadas e 1 morte nos Estados Unidos após consumo de pasta de gergelim. O produto estava contaminado com *Salmonella montevideo* e *Salmonella mbandaka* (CDC, 2013b).

No Brasil, entre os anos de 2000 a abril de 2013, as regiões Sul e Sudeste foram as que mais registraram surtos de doenças transmitidas por alimentos. Dentre os alimentos envolvidos estão ovos, doces e sobremesas, água, carne bovina, leites e carne de frango sendo *Salmonella* o principal micro-organismo envolvido, representando 39,39% dos casos (SVS, 2013).

Um surto envolvendo *Salmonella bredeney* afetou 561 funcionários de uma indústria localizada em Araraquara, SP. O micro-organismo foi detectado a partir de exames de coprocultura realizados nos doentes, sugerindo que possivelmente eles tenham ingerido alimentos contaminados durante a refeição do almoço (LANDGRAF, et al., 1985).

Em uma escola de Pontalinda, cidade localizada no Estado de São Paulo, 211 pessoas, dentre elas alunos e funcionários, passaram mal após a ingestão de patê elaborado com ovos e batatas. As análises apontaram para a presença de *Salmonella enteritidis* na concentração de 10^{-5} UFC/g do produto (KAKU et al., 1995).

SHIONARA et al. (2008), atentam para o fato de que muitos casos de gastroenterite não necessitam de hospitalizações e por este motivo o alimento responsável pela enfermidade não é investigado. Portanto, os casos totais de salmonelose em humanos, bem como as demais doenças transmitidas por alimentos, é subestimada.

A contaminação dos alimentos por *Salmonella* spp. pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtora, desde o campo até o consumidor. Entretanto, a contaminação cruzada entre os alimentos e a contaminação durante o processamento são as principais fontes de doenças de origem alimentar (GREIG e RAVEL, 2009 citado por COSTA, 2010).

Apesar dos alimentos de origem animal estarem frequentemente relacionados com surtos de *Salmonella* spp., devido a falhas higiênicas sanitárias durante o processamento industrial ou até mesmo durante o preparo do alimento em restaurantes e residências, alimentos de origem vegetal também podem sofrer contaminação cruzada por alimentos de origem animal, veiculando assim *Salmonella* spp. (GOUVÊA, 2009).

Alguns fatores importantes a serem considerados e controlados para evitar a disseminação da *Salmonella* spp. nos ambientes de produção incluem a limpeza e desinfecção das instalações, evitando assim o contato dos animais com as fezes, controle da entrada de animais portadores de salmonelose no rebanho e monitoramento da qualidade microbiológica da alimentação ofertada a esses animais (BOROWSKY, 2005).

A Resolução RDC nº 12 de 2001 (BRASIL, 2001) que estabelece os padrões microbiológicos em alimentos no Brasil, determina a ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra. Alimentos como carnes resfriadas ou congeladas, ovos, leite e derivados, frutas, alimentos prontos para consumo são exemplos de produtos que devem apresentar ausência desse micro-organismo.

2.2 Métodos para Detecção de *Salmonella* spp.

2.2.1 Método Oficial no Brasil

Segundo Borowsky (2005), o método convencional para detecção de *Salmonella* spp. pode ser dividido em 6 fases: pré-enriquecimento não seletivo (objetiva a recuperação e multiplicação das células bacterianas, incluindo as lesadas); enriquecimento seletivo (nessa fase ocorre a inibição de micro-organismos competidores, permitindo assim o crescimento preferencial da *Salmonella* spp.); semeadura em meio sólido seletivo (além de inibir micro-organismos competidores que por ventura não tenham sido inibidos na fase anterior, a semeadura em meio sólido seletivo permite a diferenciação da *Salmonella* spp. da microbiota acompanhante); triagem bioquímica (realizada em colônias suspeitas de *Salmonella* spp.); confirmação bioquímica (a partir das colônias obtidas na triagem bioquímica, são realizadas provas bioquímicas adicionais) e a sorologia (se os testes feitos na fase de triagem bioquímica e confirmação bioquímica forem indicativos de *Salmonella* spp. então é realizada a confirmação sorológica). No Brasil, este método é conhecido como oficial e preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2003).

Um dos maiores problemas do método oficial para análise de *Salmonella* spp. está na demora pelo resultado final que pode levar até sete dias para ser concluído. Outro empecilho está na necessidade de um grande número de reagentes e vidrarias (DICKEL, 2004). Por isso, a técnica oficial muitas vezes dificulta o monitoramento de contaminação e impossibilita que as ações sejam tomadas rapidamente (VON RUCKERT, 2006 citado por GOUVÊA, 2009).

2.2.2 Método Semi-Sólido Rappaport Vassiliadis – MSRV

Outro método bastante difundido no Brasil opcional ao método oficial é a técnica do MSRV estabelecida no anexo da ISO 6579 (ISO, 2002). Nesse procedimento, utiliza-se o ágar semissólido - *Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis* (MSRV) que permite detectar os sorotipos de *Salmonella* spp. que possuem flagelos (FRANCHIN, 2008 e SOARES et al., 2010).

Vários estudos já comprovaram a eficácia desse método em vários produtos. Worcman-Barninka, et al. (2001), analisaram coxas de frango, linguças frescas, chocolate granulado e coco ralado fresco utilizando os métodos preconizados pelo anexo da ISO e pelo Ministério da Agricultura. Embora não tenham encontrado *Salmonella* em amostras de chocolate granulado e coco ralado fresco, em coxas de frango e linguças frescas a detecção de *Salmonella* spp. foi equivalente em ambas os métodos.

Quanto a leitura do ágar, o método descreve que seja realizado em 24±3 horas, porém alguns estudos em alimentos e em fezes de aves observaram resultados mais confiáveis quando a leitura se fez em 48 horas (WORCMAN-BARNINKA et al., 2001; CARRIQUE-MAS et al., 2009, ERIKSSON e ASPAN, 2007). Em contrapartida, um estudo realizado em 1995 observou maior número de amostras falso-positivas quando o meio foi incubado por 48 horas (DUSCH e ALTWEGG, 1995).

2.2.3 Detecção pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

A reação em cadeia da polimerase ou *polymerase chain reaction* – PCR, foi descrita em 1986 pelo pesquisador Kary Mullis e consiste em uma síntese através de ciclos repetidos utilizando oligo-nucleotídeos de DNA para replicar sequências definidas, formando assim a base para a amplificação e detecção de sequências de ácido nucléico peculiares (MULLIS et al., 1986 e PERSING, 1991). Através da detecção do DNA do micro-organismo alvo, o método PCR pode ser considerado hoje como uma técnica de alta sensibilidade e especificidade (GOUVÊA, 2009).

Em abril de 2012, a AOAC aprovou uma técnica de detecção de micro-organismos incluindo *Salmonella* spp. da empresa 3M *Food Safety*. O método chamado de 3M MDS consegue identificar o micro-organismo alvo através da amplificação isotérmica de DNA com detecção por bioluminescência. A técnica garante a precisão dos resultados e a otimização de tempo e espaço (REVISTA LATICINIOS, 2012).

FLORES et al. (2003), realizaram uma comparação entre métodos de detecção de *Salmonella* spp. em ovos. As amostras, 360 ao total, foram analisadas segundo o método descrito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

– MAPA (BRASIL, 1995) e comparadas com a técnica PCR segundo protocolo de fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989 modificado por SANTOS et al., 1999). Nesse estudo, a PCR foi utilizada para amplificação de fragmento de DNA de 284 pb. Os autores concluíram que a técnica PCR foi tão eficiente quanto o método oficial tendo vantagens como menor custo e menor tempo de análise.

Em um estudo realizado por Dickel et al. (2005) a técnica PCR (SANTOS et al. 2001) mostrou-se mais eficiente que o método oficial (BRASIL, 1995). Amostras de carcaças de frango foram contaminadas artificialmente com *Salmonella Enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em diluições que variaram de 10^{-4} a 10^{-9} conforme o micro-organismo. Para a técnica PCR, segundo o método citado, o DNA foi extraído através do protocolo de tratamento térmico sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram amplificação de um fragmento de 284 pb, visualizado sobre luz ultravioleta. Dos 300 ensaios realizados, o método oficial recuperou 56,7% das amostras enquanto que a técnica PCR detectou 75% do micro-organismo.

GOUVÊA (2009) comparou o método oficial (BRASIL, 2003) com o método PCR (SAMBROOK, 1989) em 31 carcaças de frango coletadas em campo e 34 carcaças de frango contaminadas artificialmente. A extração do DNA das amostras foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio com posterior amplificação de fragmento de DNA de 284 pb. O autor concluiu que as duas técnicas foram eficientes para detecção de *Salmonella* spp. em amostras contaminadas artificialmente, porém o isolamento através do método oficial foi mais eficiente que a técnica PCR em amostras de campo.

Dentre os métodos analíticos oficiais reconhecidos principalmente no Brasil, as técnicas tradicionais de análise de micro-organismos em alimentos ainda continuam sendo as mais utilizadas. Entretanto, no futuro, as necessidades farão com que métodos moleculares de análise sejam alternativas viáveis, confiáveis e fundamentais (GANDRA et al., 2008). Por isso, torna-se extremamente importante que pesquisas comparativas sejam desenvolvidas para atestar a eficiência dessas novas técnicas, beneficiando assim tanto a indústria alimentícia, que conseguirá liberar o produto em um curto espaço de tempo, quanto o consumidor, que poderá ter a certeza de adquirir um alimento seguro.

3 HIPÓTESES

O Método Semissólido Rappaport Vassiliadis – MSRV (ISO, 2002) e o Método Molecular da Empresa 3M *Food Safety* (AOAC, 2012) apresentam eficácia equivalente ao Método Oficial descrito na Instrução Normativa N.62 (BRASIL, 2003) para identificação de *Salmonella* spp. em amostras de leite contaminado artificialmente e em produtos cárneos.

4 OBJETIVOS E METAS

4.1 Objetivo

Avaliar o método mais específico, preciso e rápido para identificação de *Salmonella* spp. em amostras de *Salmonella* spp. previamente isolados pertencentes ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas - RS e em isolados provenientes de produtos cárneos.

4.1.1 Objetivos Específicos

- a) Avaliar e comparar um método molecular e um método fenotípico com o método fenotípico oficial no país para identificação de *Salmonella* spp. em produtos cárneos;
- b) Avaliar e comparar um método molecular e um método fenotípico com a metodologia fenotípica oficial no país para identificação de *Salmonella* spp. em amostras de leite artificialmente contaminadas com micro-organismos previamente isolados de diferentes alimentos;
- c) Avaliar a ausência e/ou presença de *Salmonella* spp. em produtos cárneos vendidos em açougues da Cidade de Pelotas-RS.

4.2 Metas

- a) Ter identificado comparativamente *Salmonella* spp. em produtos cárneos e em amostras de leite contaminadas artificialmente com seis micro-organismos previamente isolados de alimentos, através de três métodos de análise: Instrução Normativa N.62 (BRASIL, 2003), MSRV - ISO 6579:2007 – E, ISO 65:79:2002/amd. 1:2007 (E) Annex D, (ISO, 2002) e 3M MDS (AOAC, 2012);

- b) Ter verificado comparativamente a aplicabilidade e eficácia destes métodos contribuindo com as indústrias do setor e com laboratórios de análise na escolha do melhor método de trabalho;
- c) Ter avaliado a presença de *Salmonella* spp. em noventa produtos cárneos comercializados por quatro açougues na Cidade de Pelotas – RS;
- d) Pelo menos um artigo científico em periódico de alto impacto técnico-científico, publicado ou aceito para publicação com co-autoria de discentes da graduação e da pós-graduação;
- e) Quatro trabalhos apresentados em eventos científicos de importância;
- f) Uma dissertação de mestrado;
- g) Uma mestranda titulada e dois estudantes de iniciação científica capacitados.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Comparação entre os Métodos Oficial, MSRV E 3M MDS para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de leite UHT contaminadas artificialmente

Amostras de leite UHT serão contaminadas artificialmente com concentrações de 10^1 UFC.mL⁻¹, 10^2 UFC.mL⁻¹ e 10^3 UFC.mL⁻¹ de seis isolados de alimentos de *Salmonella* spp. pertencentes ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas – RS, duas cepas padrão de *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis* e duas cepas padrão como controle negativo *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*. Todas as amostras serão analisadas pelos três métodos de detecção estudados: Oficial, MSRV e 3M MDS conforme descrito no Quadro 01.

Quadro 01 – Detecção de *Salmonella* spp. em amostras de leite UHT contaminadas artificialmente através dos Métodos Oficial, MSRV e 3M MDS

Amostras	Variáveis Independentes	Variáveis Dependentes
Leite UHT	Micro-organismos: 6 Isolados 2 Cepas Padrão Controle Positivo 2 Cepas Controle Negativo	Identificação de <i>Salmonella</i> spp.
	Métodos: Oficial MSRV 3M MDS	
Total de Ensaios: 10 Micro-organismos x 3 Repetições x 3 Métodos = 90 determinações		

Fonte: A Autora

5.2 Comparação entre os Métodos Oficial, MSRV E 3M MDS para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de produtos cárneos comercializadas em açougues da Cidade de Pelotas – RS

Serão avaliadas quanto à presença de *Salmonella* spp. 90 amostras de produtos cárneos comercializados em quatro diferentes açougues na Cidade de Pelotas – RS. Todas as amostras serão analisadas pelos três métodos de detecção estudados: Oficial, MSRV e 3M MDS, como exemplifica o Quadro 02.

Quadro 02 – Detecção de *Salmonella* spp. em amostras de produtos cárneos através dos Métodos Oficial, MSRV e 3M MDS

Amostras	Variáveis Independentes	Variáveis Dependentes
90 produtos cárneos	Produtos Cárneos: 90	Identificação de <i>Salmonella</i> spp.
	Métodos: Oficial MSRV 3M MDS	
Total de Ensaios: 90 amostras x 3 Métodos = 180 determinações		

Fonte: A Autora

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Comparação entre os Métodos Oficial, MSRV E 3M MDS para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de leite UHT contaminadas artificialmente

6.1.1 Culturas Microbianas

Na primeira etapa do estudo serão utilizadas culturas puras de seis diferentes isolados de *Salmonella* spp. pertencentes ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul – Brasil, duas cepas padrão como controle positivo *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 1306) e duas cepas padrão *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Proteus vulgaris* (ATCC 29905) como controles negativo.

6.1.2 Reativação de Culturas

As culturas mantidas sob congelamento em Glicerol (*propano-1,2,3-triol*) e as cepas padrão de controles positivo e negativo, recebidas do fabricante e mantidas resfriadas em geladeira, serão transferidas para caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 35°C durante 24h. Em seguida serão transferidas para ágar seletivos BPLS (*Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose*) e XLD (*Xylose Lysine Deoxycholate Modified Agar*) para confirmação da sua pureza.

6.1.3 Quantificação das Culturas

A partir das culturas descritas no item 6.1.1 e reativadas conforme descrito no item 6.1.2, 1mL será transferido para caldo TSB que permanecerá em estufa a 36°C±1°C por 24 horas. Concentrações 10¹ UFC.mL⁻¹ até 10³ UFC.mL⁻¹ serão preparadas a partir do método turbidimétrico conforme descrito a seguir no item 6.1.3.1.

6.1.3.1 Construção de uma Curva Padrão correlacionando densidade ótica com concentração microbiana.

As concentrações microbianas destas culturas serão determinadas através do método turbidimétrico segundo Rodrigues (2002) com modificações. Uma alíquota de 0,1 mL de caldo TSB com crescimento bacteriano será semeado em ágar TSA e incubado a 37°C por 24 horas. Em seguida uma alçada do crescimento obtido em ágar TSA será diluída em solução salina 0,85% a fim de se obter um turbidez semelhante a escala 0,5 de MacFarland o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹. A partir de 1 mL da água salina 0,85% inoculada com o isolado, serão realizadas diluições em escala seriada decimal até 10^1 UFC.mL⁻¹. As diluições 10^{-1} UFC.mL⁻¹, 10^{-2} UFC.mL⁻¹ e 10^{-3} UFC.mL⁻¹ serão selecionadas e semeadas em duplicata em ágar TSA com incubação a 37°C por 24 horas, para quantificação exata que será testada. Em paralelo, a partir de uma alíquota de cada uma destas diluições será realizada a leitura da densidade ótica a 580nm afim de correlacionar a densidade ótica com a concentração microbiana.

As leituras espectrofotométricas serão correlacionadas com o número de UFC.mL⁻¹ obtido no ágar TSA e a partir delas será estruturada uma curva padrão. Com base na curva construída, serão determinadas as concentrações bacterianas a serem utilizadas na contaminação das amostras de leite UHT.

6.1.4 Amostras

Amostras de 22,5mL leite UHT em triplicata serão contaminadas artificialmente com 2,5mL de água salina com concentrações variando 10^1 UFC.mL⁻¹, 10^2 UFC.mL⁻¹ e 10^3 UFC.mL⁻¹ a partir das culturas descritas no item 6.1.1.

6.1.5 Pré-Enriquecimento

Na etapa de pré-enriquecimento serão utilizados 25mL de amostra de leite contaminadas conforme descrito no item 6.1.4, e a elas será acrescentado o diluente Água Peptonada Tamponada 0,1% na proporção de 1:10 sobre a amostra (sendo uma parte de amostra para nove partes de diluente). Posteriormente, as amostras serão incubadas em estufa a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 ± 2 horas e analisadas através dos três métodos a serem avaliados.

6.2 Comparação entre os Métodos Oficial, MSRV E 3M MDS para Detecção de *Salmonella* spp. em Amostras de Produtos Cárneos Comercializadas em Açougues da Cidade de Pelotas – RS

6.2.1 Coleta e Preparo das Amostras

Serão realizadas, por conveniência, coletas de 90 produtos cárneos não processados em quatro açougues na Cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. As amostras serão acondicionadas em sacolas térmicas e imediatamente serão levadas ao laboratório para análise.

6.2.2 Etapa de Pré-Enriquecimento

Na etapa de pré-enriquecimento será pesado aproximadamente 25g de amostra e a ela será acrescentado o diluente Água Peptonada Tamponada 0,1% na proporção de 1:10 sobre o peso da amostra (uma parte de amostra para nove partes de diluente). Posteriormente, a amostra será incubada em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 ± 2 horas e analisada através das três metodologias avaliadas.

6.3 Métodos

As amostras serão avaliadas qualitativamente através de duas técnicas de análise fenotípicas comumente utilizadas para detecção de *Salmonella* spp. e um método fundamentado em técnicas de biologia molecular, como segue, respectivamente:

- a) Método Oficial – Preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, segundo Instrução Normativa N.62 (BRASIL, 2003);
- b) Método MSRV – Descrito pela International Organization for Standardization – ISO (ISO, 2002);
- c) Método 3M MDS - Validado pela Association of Official Analytical Chemistry – AOAC (AOAC, 2012).

6.3.1 Método Preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – Oficial

Serão realizados procedimentos recomendados pelo protocolo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2003) conforme descrito a seguir:

6.3.1.1 Enriquecimento Seletivo

A partir da amostra pré-enriquecida, como descrito em cada experimento, será transferido 1mL da amostra para um tubo contendo 10mL de Caldo Mueller Kauffman Tetrationato com posterior homogeneização. Os tubos permanecerão em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas.

Paralelamente a essa etapa, será transferido 0,1mL da amostra pré-enriquecida para tubos contendo 9,9mL de Caldo Rappaport Vassiliadis que serão incubados em estufa a $41^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas.

6.3.1.2 Isolamento e Seleção

A partir dos caldos de enriquecimento seletivo (Mueller Kauffman Tetrationato e Rappaport Vassiliadis) uma alçada será semeada em placas de Ágar BPLS (*Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose*) e Ágar XLD (*Xylose Lysine Deoxycholate Modified Agar*). As placas permanecerão em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas.

Após esse período, as placas que não apresentarem crescimento de colônias serão consideradas negativas para presença de *Salmonella* spp. Nas placas que apresentarem crescimento, serão selecionadas 3 a 10 colônias características. Essas colônias serão semeadas em placas contendo ágar nutriente com posterior incubação em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.

A partir das colônias obtidas em ágar nutriente ocorrerá a semeadura para tubos com Caldo Uréia, ágar TSI (*Triple Sugar Iron Agar*), ágar LIA (*Lysine Iron Agar*) e ágar SIM (*Sulfide Indole Motility*). A incubação será realizada em estufa a

36°C±1°C por 18-24 horas. Para as colônias que apresentarem urease negativa e características nos ágaros TSI, LIA e SIM será realizado o teste sorológico.

6.3.1.3 Teste Sorológico - Aglutinação Rápida

O teste sorológico é realizado a partir das colônias obtidas em ágar nutriente que apresentaram características positivas para *Salmonella* spp. no Caldo Ureia e nos ágaros TSI, LIA e SIM.

O teste de aglutinação será feito com anti-soro polivalente “O” retirando uma alçada das colônias e transferindo-as para uma lâmina ou placa de sorologia, homogeneizando-a com o diluente (solução fisiológica). Uma gota do soro polivalente somático “O” será adicionada e posteriormente será feita nova homogeneização. Será observada a aglutinação em até 3 minutos, o que evidenciará *Salmonella* spp. positiva.

6.3.2 Método *Rappaport-Vassiliadis* em ágar *Semissólido modificado MSRV*, Preconizado pela *International Organization for Standardization – ISO*

Outro procedimento adotado no estudo é o método *Rappaport-Vassiliadis* em ágar semissólido modificado (MSRV) apresentado em ISO 65:79:2002/amd. 1:2007 (E) Annex D conforme descrito abaixo (com modificações):

6.3.2.1 Isolamento e Seleção

A partir das amostras pré-enriquecidas conforme descrito em cada experimento, serão distribuídas 3 gotas de 33µL em locais equidistantes da placa de ágar semissólido MSRV (*Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis*). As placas serão acondicionadas sem inverter em sacos plásticos perfurados e incubadas em estufa com circulação forçada de ar a 41,5°C±1°C por 24±3horas.

As amostras que aparentemente não apresentarem motilidade em 24±3horas, serão reincubadas novamente por mais 24±3horas, totalizando 48horas. Se após esse período não houver crescimento de motilidade nas placas, as mesmas serão consideradas negativas para presença de *Salmonella* spp. Apesar de não citado

pelo método oficial, a reincubação das placas por mais 24 ± 3 horas será realizada devido a discordância de vários autores quanto ao tempo ideal de incubação, levantada pela revisão bibliográfica.

As amostras que apresentarem motilidade são consideradas suspeitas de *Salmonella* spp., e, a partir delas, uma alçada da zona migratória será transferida por estriamento para meios seletivos XLD e BPLS, o quais serão incubados em estufa a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas. Após esse período, serão escolhidas de cada placa 3 a 10 colônias características que serão semeadas em placas contendo ágar nutriente. A incubação será de 18 a 24 horas em estufa por $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

A partir das colônias obtidas em ágar nutriente ocorrerá a semeadura para tubos com Caldo Uréia, ágar TSI (*Triple Sugar Iron Agar*), ágar LIA (*Lysine Iron Agar*) e ágar SIM (*Sulfide Indole Motility*). A incubação será realizada em estufa a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas. Nas colônias urease negativa e características nos ágar TSI, LIA e SIM será realizado o teste sorológico.

6.3.2.2 Teste Sorológico - Aglutinação Rápida

O teste sorológico é realizado a partir das colônias obtidas em ágar nutriente que apresentaram características positivas para *Salmonella* spp. no Caldo Ureia e nos ágar TSI, LIA e SIM.

O teste de aglutinação será feito com anti-soro polivalente “O” retirando uma alçada das colônias características obtidas em ágar nutriente e transferindo-as para uma lâmina ou placa de sorologia, homogeneizando-a com o diluente (solução fisiológica). Uma gota do soro polivalente somático “O” será adicionada e posteriormente será feita nova homogeneização. Será observada a aglutinação em até 3 minutos, o que evidenciará *Salmonella* spp. positiva.

6.3.3 Método 3M MDS (*Molecular Detection System*) Aprovado pela Association of Official Analytical Chemistry - AOAC

6.3.3.1 Isolamento, Seleção e Resultados

A partir da etapa de pré-enriquecimento descrita em cada experimento, serão transferidos 20 uL da amostra pré-enriquecida para um tubo específico do termobloco. Esses tubos serão aquecidos a 100°C por 15 minutos e logo em seguida serão resfriados por 10 minutos em uma temperatura que poderá variar entre -10°C e -20°C.

Decorrida a etapa de resfriamento, os tubos serão agitados e permanecerão em repouso por 5 minutos. Após essa etapa, 20 uL da amostra serão transferidos para os tubos contendo os reagentes do kit “Molecular Detection System – 3M MDS”, os quais serão inseridos no equipamento para posterior execução da etapa de amplificação de DNA durante 75 minutos. Os resultados positivos e negativos para presença de *Salmonella* spp. serão apontados no visor do monitor em cor vermelha.

6.3.4 Avaliação Estatística

Os resultados obtidos serão tratados estatisticamente por meio de análise de variância seguido do Teste de Tukey, com $p < 0,05$. A partir da avaliação estatística, os resultados serão avaliados e confrontados entre si e com pesquisas já publicadas.

7 RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

Como ainda não é possível erradicar totalmente *Salmonella* spp. dos ambientes de produção de alimentos, espera-se contribuir com informações para escolha de métodos mais adequados em função dos propósitos para identificação deste micro-organismo com aplicabilidade a indústrias de alimentos e laboratórios de pesquisa. Dessa forma, visa-se colaborar com as indústrias brasileiras do setor e com os laboratórios que poderão utilizar os resultados desse experimento na escolha de um método rápido e confiável.

Como impacto, de maneira mais ampla, espera-se beneficiar as indústrias brasileiras e os consumidores, primeiro pela liberação do produto em menor tempo e segundo pela certeza de ser livre de patógenos do tipo *Salmonella* spp.

Ao ser comprovada a eficiência do teste molecular, outras pesquisas poderão ser realizadas com outros patógenos de importância como *Listeria monocytogenes* e *E. coli* H7 O157.

Por fim espera-se obter uma dissertação e no mínimo uma publicação em periódicos nacionais e/ou internacionais de elevado impacto da área de nutrição/ciência e tecnologia de alimentos.

8 CRONOGRAMA DO PROJETO

Quadro 03 – Cronograma do Projeto

Atividades Propostas	2014												2015		
	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	
Apresentação do Projeto a Banca de Qualificação	X														
Correção do Projeto		X													
Reunião com Orientadores para ajustes e delineamento das análises		X													
Preparação de Meios de Cultura			X												
Desenvolvimento da Curva através Método Turbidimétrico			X												
Reativação das Cepas já Isoladas do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas				X											
Desenvolvimento do Experimento				X	X	X	X								
Avaliação dos Resultados								X							
Escrita da dissertação e Artigos									X	X	X	X	X		
Defesa da Dissertação													X		
Entrega da dissertação corrigida e documentos exigidos para o PPGNA														X	

Fonte: A Autora

9 ORÇAMENTO

Será realizada a compra do Kit 3M MDS Salmonela, com capacidade para 96 testes ao custo de R\$ 2.472,96. Os equipamentos necessários para a realização da análise molecular serão cedidos pela Empresa 3M *Food Safety* conforme consulta já realizada.

Os ágar MSRV e o suplemento utilizado no preparo do meio foi gentilmente cedido pela empresa BRF S.A.

Demais meios e materiais serão disponibilizados pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos e pelos pesquisadores envolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, R. B.; et al. **Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*.** Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.77, n.4, p.741-750, out./dez., 2010.

AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. **Método 031208.** In: Official methods of analysis to AOAC International. Washington, Apr. 2012.

BOROWSKY, L. M. **Comparação de dois métodos de quantificação de *Salmonella* sp. em embutidos suínos.** Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal de Porto Alegre – UFRGS, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria nº 8 de 23 de janeiro de 1995 - Aprova alterações introduzidas no método analítico de carcaça de aves e pesquisa de *Salmonella*.** Diário Oficial da União, Seção I, p.1182, jan., 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde - ANVISA. **Resolução RDC N°12 de 02 de Janeiro de 2001.** Brasília, jan., 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n.62, de 26 de agosto de 2003 - Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.** In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio. Mundial e Brasil.** Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Análise epidemiológica de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil.** Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2008.

CARRIQUE-MAS, J. J.; et al. **Comparison of three plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry environmental samples in Great Britain using ISO 6579:2002 (Annex D).** Journal of Applied Microbiology; v.107, n.6, p.1976-1983. Dec, 2009.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of *Salmonella* Hadar Infections Associated with Turkey Burgers.** Apr., 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/hadar0411/040411/index.html>. Acesso em: 26/11/2013.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of *Salmonella enteritidis* Infections Linked to Ground Beef (Final Update).** Sept., 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis-07-12/index.html>. Acesso em: 25/11/2013.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of *Salmonella typhimurium* Infections Linked to Ground Beef (Final Update)**. Mar., 2013a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-01-13/index.html>. Acesso em: 26/11/2013.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of *Salmonella montevideo* and *Salmonella mbandaka* Infections Linked to Tahini Sesame Paste (Final Update)**. July, 2013b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/montevideo-tahini-05-13/>. Acesso em: 26/11/2013.

COSTA, C. A. R. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo**. 127p. Tese de Doutorado. USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2010.

DICKEL, E. L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de (*Salmonella*) em carcaças de frango para o controle higiênico-sanitário do processo de abate**. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 137f. Porto Alegre, 2004.

DICKEL, E. L.; et al. **Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente**. Revista Brasileira de Ciências Veterinárias, v. 12, n.1/3, p.5-10, jan./dez., 2005.

DUSCH, H.; ALTWEGG, M. **Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species**. Journal of clinical microbiology; v.33, n.4, p. 802-804, Apr., 1995.

ERIKSSON, E.; ASPAN, A. **Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry**. BioMed Central Veterinary Research, v.3, n.21, 2007.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Moon Marina USA Corporation voluntarily recalls frozen raw yellowfin tuna product “Nakaochi Scrape” associated with a multistate outbreak of *Salmonella* Bareilly infections**. Apr., 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov/safety/recalls/ucm300412.htm>. Acesso em 25/11/2013.

FLORES, M. L.; et al. **Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da Reação em Cadeia da Polimerase**. Ciência Rural, Santa Maria - RS, v.33, n.3, maio, 2003.

FRANCHIN, P. R. **Comparação de metodologias alternativas para detecção de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em carnes e produtos cárneos**. 103 f.

Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GOUVÊA, R. **Comparação entre isolamento bacteriológico convencional e PCR na detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas e de campo.** 54 f. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal Fluminense. Medicina Veterinária. Niteroi 2009.

GANDRA, E. A.; et al. **Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos.** Acta Science, Technology and Management. Maringá, v. 30, n.1, 2008.

GREIG, J.D.; RAVEL, A. **Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution.** International Journal of Food Microbiology, v.130, n.2, 2009.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, **ISO 6579: detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.** Geneva, 2002. 9p. Amd 1:2007, annex D.

JAY, J. M. **Modern food microbiology.** 5 ed. New York: Chapman & Hall, 1992.

KAKU, M.; et al. **Surto alimentar por *Salmonella Enteritidis* no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.** Revista de Saúde Pública, v.29, n.2. São Paulo: Abr., 1995.

LANDGRAF, M.; et al. **Surto de toxinfecção alimentar por *Salmonella bredeney*.** Revista de Saúde Pública, v.19, n.1. São Paulo: Fev. 1985.

MOREIRA, N. M. **Métodos de tipificação de *Salmonella* sp.** Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2012.

MULLIS, K.; et al. **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** In: Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology, 1986.

PERESI, J. T. M.; et. al. **Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella enteritidis*.** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. São Paulo – SP. Revista de Saúde Pública, v.32, n.5, out., 1998.

PERSING, D. H. **Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches.** Journal of Clinical Microbiology, Minesota, EUA, v.29, n.7, jul., 1991.

PINTO, U. M.; et al. **Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar.** Revista de Nutrição, v.17, n.3, jul./set., 2004.

REIS, R. B.; et al. **Padronização de um teste imunoenzimático para detecção de *Salmonella* em Alimentos.** Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Campinas, maio/ago., 2002.

REVISTA LATICÍNIOS. **3M Food Safety Lança Sistema Inovador de Identificador de Patógenos em Alimentos**. Painel Fermentch. Ano XVII, n.96, mai/jun., 2012.

RODRIGUES, A. E. C. **Desenvolvimento de um Método Voltamétrico para a Avaliação do Crescimento Microbiano**. Dissertação de Mestrado em Ciências. Universidade do Minho, Braga, 2002.

SANTOS, L. R.; et al. **Protocolos para a extração de DNA de *Salmonella***. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v.27, n.2, 1999.

SANTOS, L. R.; et al. **Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, v.29, n.2, p.87-92, 2001.

SAMBROOK, J.; et al. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2ed., v.3, 1989.

SHINOHARA, N. K. S. et al. ***Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos**. Ciência & Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v.13, n.5, Set./Out., 2008.

SILVA, N.; et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3 ed. 552p. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SILVA, N.; et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 4 ed. 624p. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SOARES, C. M.; et al. **Avaliação do Método MSRV (Draft Annex D/ISO 6579:2002) para detecção de *Salmonella* spp. em Farelo de Soja**. Comunicado Técnico – EMBRAPA – Rio de Janeiro, RJ. Dez., 2010.

SVS – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos**. Abr., 2013.

USDA - DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS. **Public Health Alert for Chicken Products Produced at Three Foster Farms Facilities**. Oct., 2013. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/newsroom/news-releases-statements-and-transcripts/news-release-archives-by-year/archive/2013/pha-100713>. Acesso em 25/11/2013.

VON RUCKERT, D. A. S. **Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoanálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella* spp. em frangos de corte durante o abate**. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa. 62f. Viçosa, 2006.

WORCMAN-BARNINKA, D.; et al. **Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport–Vassiladis medium (MSRV) for the detection of**

***Salmonella* in foods.** International Journal of Food Microbiology, v.64, n.3, p.387–393. Mar., 2001.

4 RELATÓRIO DE TRABALHO DE CAMPO

Procurou-se seguir a proposta apresentada no projeto de pesquisa presente nesta dissertação, porém algumas alterações necessárias foram realizadas em função de limitações e para que o experimento pudesse ser executado em tempo hábil com êxito.

Entre as 180 amostras inicialmente propostas no projeto de pesquisa apresentado anteriormente, foram analisadas 92 em virtude do elevado custo do kit 3M MDS® e, por esse motivo, optou-se por utilizar 3 micro-organismos e avaliar 29 amostras de campo.

A quantificação das culturas não foi realizada através de método turbidimétrico conforme descrito no projeto em função terem sido obtidos bons resultados utilizando a comparação com a Escala de MacFarland.

Em função da disponibilidade de material, no método padrão preconizado pelo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA foram utilizados na etapa de enriquecimento seletivo os Caldos Tetrationato, Rappaport Vassiliadis e Selenito Cistina.

A partir dos resultados obtidos na fase de testes (dados não mostrados), observou-se melhor desempenho do Ágar Semissólido Rappaport Vassiliadis quando incubado a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Por esse motivo, as placas que não apresentaram motilidade característica após 24 horas de incubação foram consideradas negativas para a presença de *Salmonella* spp., não sendo novamente incubadas por 24 ± 3 horas como proposto no projeto de pesquisa.

Considerando a disponibilidade de material e a importância de informações mais específicas, foram acrescentadas as avaliações de resistência a antimicrobianos e de capacidade de formação de biofilme nos isolados de *Salmonella* spp. obtidos.

5 ARTIGOS

Este trabalho deu origem aos artigos:

- “Avaliação da Capacidade de Formação de Biofilmes e da Resistência a Antimicrobianos de *Salmonella* spp. isolados em Produtos Cárneos provenientes da Região Sul do Brasil” que será submetido para publicação no “Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos – CEPPA”, conceituado como “B2” na área de Ciência dos Alimentos;
- “Comparação de Métodos Fenotípicos e Molecular 3M MDS® para Identificação de *Salmonella* spp.” que será traduzido para a língua inglesa e posteriormente submetido para publicação no periódico “Food Control”, conceituado como “A2” na área de Ciência dos Alimentos.

5.1 Artigo 1

Avaliação da Capacidade de Formação de Biofilmes e da Resistência a Antimicrobianos de *Salmonella* spp. isolados em Produtos Cárneos provenientes da Região Sul do Brasil

GREICI BERGAMO*
CLÁUDIO DIAS TIMM**
FERNANDA DEMOLINER*
ELIZABETE HELBIG***
ELIEZER AVILA GANDRA****

Salmonella spp. é um micro-organismo amplamente estudado devido aos sérios riscos que pode causar a saúde humana. Como mecanismo de defesa, essa bactéria tem a capacidade de resistir a certos tipos de substâncias antimicrobianas e de colonizar superfícies formando um biofilme e dificultando a sua eliminação. Em virtude disso, foi avaliada a presença de *Salmonella* spp. em 89 amostras de produtos cárneos comercializadas na Região Sul do Rio Grande do Sul e, a partir dos isolados obtidos, foi verificada a capacidade de resistência a agentes antimicrobianos e de formação de biofilme em superfícies de poliestireno. Foi constatada a presença de *Salmonella* spp. em 19,1% das amostras avaliadas. Dos isolados obtidos, 40% (n=15) mostraram resistência a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados e 33,3% manifestaram-se multirresistentes. Apenas o antimicrobiano Amicacina (30µg) foi eficaz na inibição de todos os isolados testados. Nenhum isolado mostrou-se capaz de formar biofilmes em superfícies de poliestireno. A presença de *Salmonella* spp. em amostras de produtos cárneos indica falhas e falta de cuidados higiênicos na cadeia produtiva e o alto índice de resistência a antimicrobianos demonstra que cuidados devem ser reforçados ao administrar essas substâncias sem necessidade específica tanto em humanos quanto em animais.

PALAVRAS-CHAVE: ANTIBIÓTICO, LINGUIÇA FRESCAL, MULTIRRESISTÊNCIA.

Salmonella spp. is a microorganism widely studied due to serious risks which may cause human health. As a defense mechanism, this bacterium has the ability to resist certain types of antimicrobial substances and colonize surfaces forming a biofilm and hindering their elimination. The objective of the study was to evaluate the presence of

* Mestrandas do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS (e-mail: grei_b@hotmail.com e fernandademoliner@yahoo.com.br).

** Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Inspeção de Produtos de Origem Animal, UFPEL, Pelotas, RS (e-mail: claudiotimm@hotmail.com).

*** Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Nutrição, UFPEL, Pelotas, RS (e-mail: helbignt@gmail.com).

**** Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, UFPEL, Pelotas, RS (e-mail: gandraea@hotmail.com).

Salmonella spp. in 89 samples of meat products marketed in southern Rio Grande do Sul and from isolates obtained was verified the ability of resistance to antimicrobials and biofilm formation on polystyrene surfaces. The presence of *Salmonella* spp. was found in 19.1% of the samples. Of the isolates obtained, 40% (n = 15) showed resistance to at least one of the tested antimicrobials and 33.3% expressed multiresistant. Only the antimicrobial Amikacin (30µg) was effective in inhibiting all isolates tested. No isolate was able to form biofilms on polystyrene surfaces. The presence of *Salmonella* spp. in samples of meat products indicates failures and lack of hygienic care in the production chain of meat. The high antimicrobial resistance index shows that care must be reinforced to administer antimicrobial substances without necessity in humans and animals.

KEYWORDS: ANTIBIOTICS, SAUSAGE FRESCAL, MULTIRESISTANCE.

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais micro-organismos investigados em produtos alimentícios é *Salmonella* spp. Essa bactéria possui ampla faixa de atuação, podendo causar doenças graves, principalmente em idosos, crianças e imunodeprimidos, que necessitam de hospitalização e de um cuidado rigoroso, representando altos custos sociais e econômicos (BAJPAI et al., 2012). Nos Estados Unidos são registrados anualmente 23.000 hospitalizações e 450 óbitos devido a infecções causadas por *Salmonella* spp. (YANG et al., 2015). No Brasil, entre os anos de 2000 a abril de 2013, 39,39% das doenças transmitidas por alimentos apontaram *Salmonella* spp. como agente responsável, e os alimentos com maior incidência de contaminação foram ovos, doces e sobremesas, água, carne bovina, leites e carne de frango (BRASIL, 2013).

Em relação a cadeia da carne, a contaminação por *Salmonella* spp. pode ocorrer em todas as etapas do processo de fabricação, desde o abate dos animais, onde os micro-organismos que estão no intestino podem contaminar as carcaças, até a venda dos produtos, devido a contaminação cruzada ou falta de higiene dos manipuladores (CARVALHO e CORTEZ, 2005).

Após o desenvolvimento de uma infecção causada por *Salmonella* spp. em humanos ou animais, são utilizados agentes antimicrobianos afim de cessar o processo infeccioso. Como muitas vezes esses medicamentos são utilizados de maneira inadequada, as bactérias podem criar mecanismos que as tornam resistentes a essas drogas e por esse motivo, micro-organismos patogênicos como *Salmonella* spp., vem sendo amplamente estudados quanto a essa característica (SOUZA et al., 2010). Na pecuária, os agentes antimicrobianos são utilizados como promotores do crescimento e na prevenção e tratamento de doenças. Como muitos desses medicamentos também são utilizados no tratamento de doenças em humanos, tem-se aumentado o risco do surgimento de bactérias resistentes e multirresistentes que podem ocasionar infecções de difícil tratamento (OMS, 2012).

Por possuir fímbrias, *Salmonella* spp. consegue se aderir mais facilmente e colonizar superfícies formando biofilmes (GIBSON et al., 2007). Ao fazer parte da estrutura de um biofilme, as bactérias tornam-se mais tolerantes ao estresse e passam a ter uma maior resistência a antibióticos e desinfetantes, o que dificulta a sua eliminação. Existe ainda a preocupação do biofilme em atuar como um substrato, atraindo bactérias que normalmente não teriam a capacidade de forma-lo.

Esses fatores são preocupantes nas linhas de produção de indústrias alimentícias, uma vez que a grande concentração de células aderidas aos equipamentos podem facilmente contaminar lotes inteiros de produtos (LAPIDOT, ROMLING e YARON, 2006).

Os objetivos desse estudo foram avaliar a presença de *Salmonella* spp. em amostras de produtos cárneos comercializadas em estabelecimentos comerciais da Região Sul Rio Grande do Sul - Brasil e, a partir dos isolados encontrados, verificar a resistência a agentes antimicrobianos e a formação de biofilme em superfícies de poliestireno.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de produtos cárneos foram coletadas em estabelecimentos comerciais localizados no Sul do Rio Grande do Sul, no período de junho a novembro de 2014. Elas foram adquiridas na forma como eram comercializadas, “a granel”, acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e imediatamente encaminhadas para análise no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas. Ao todo foram coletadas 89 amostras, sendo 47 de linguiça suína frescal, 15 de linguiça mista frescal (elaborada com carne suína e bovina), 12 de carne bovina moída, 8 de cortes de frango, 5 de carne bovina em pedaços e 2 de linguiça de frango frescal.

2.2 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Salmonella* spp.

As amostras foram avaliadas pelos métodos descritos pela Instrução Normativa N.62 (BRASIL, 2003) e pelo anexo D da ISO 6579:2002/Amd.1:2007(E) (ISO, 2007).

Para a etapa de pré-enriquecimento, foram pesadas 25g de cada amostra e a elas foram acrescentados 225mL de Diluente Água Peptonada Tamponada 0,1% (APT), seguida de incubação a 37°C por 20 horas. Após este período, foram transferidos 100µL da amostra para um tubo contendo 9,9mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (RV) e para placas contendo Ágar Semissólido Rappaport Vassiliadis (MSRV) e 1mL para tubos contendo 10mL de Caldo Selenito Cistina (SC) e para 10mL de Caldo Tetracionato (TT) para a etapa de enriquecimento seletivo. Os tubos foram homogeneizados e incubados junto com as placas de ágar a 42°C durante 24 horas.

A partir das placas de Ágar MSRV com crescimento característico de *Salmonella* spp. e dos tubos contendo crescimento nos caldos de enriquecimento seletivo, foram semeadas placas de Ágar *Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose* (BPLS) e Ágar *Xylose Lysine Deoxycholate Modified* (XLD) seguida de incubação a 37°C por 24 horas.

Após esse período, nas placas que apresentaram crescimento com morfologia característica para *Salmonella* spp. foram selecionadas 3 colônias e semeadas em placas contendo ágar nutriente com posterior incubação a 37°C por 24 horas. A partir das colônias obtidas em ágar nutriente realizou-se a identificação bioquímica em tubos com Caldo Uréia, Ágar *Triple Sugar Iron* (TSI) e Ágar *Lysine Iron Agar* (LIA) com incubação a 37°C por 24 horas. As colônias que apresentaram

reações características de *Salmonella* spp. nos ágaros TSI, LIA e no Caldo Uréia foram submetidas a teste sorológico de aglutinação rápida com soro polivalente anti-*Salmonella* somático “O” e flagelar “H”. Quando observada a aglutinação em até 3 minutos, a amostra foi considerada positiva para *Salmonella* spp.

Os isolados identificados como *Salmonella* spp. foram mantidos sob congelamento em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e Glicerol (*propano-1,2,3-triol*) na proporção de 750µL de BHI para 250µL de Glicerol para posterior teste de avaliação da resistência a antimicrobianos e da capacidade de formação de biofilme.

2.3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados foi testada através do método de disco-difusão de acordo com protocolo proposto pelo *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2005a). A partir da cultura congelada, o isolado foi reativado em Caldo BHI por 37°C por 24h, e após o período uma alçada de cada isolado foi transferida para placas de Ágar Triptona de Soja (TSA) que foram incubadas a 37°C durante 24h. As culturas foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,85%) e padronizadas na concentração 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) sendo posteriormente semeadas com swab estéril em Ágar Muller-Hinton. Após a secagem do ágar, multidiscos de antibiótico da marca Laborclin® foram inseridos e as placas foram incubadas a 35°C por 24h. Os halos de inibição foram medidos e interpretados de acordo com as normas do CLSI (2005b). Os isolados de *Salmonella* spp. foram classificados como sensível, intermediário e resistente. Os antibióticos testados foram amoxicilina mais clavulanato (20µg e 10 µg), amicacina (30µg), ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), gentamicina (10µg), sulfametaxazol mais trimetoprim (23,75µg e 1,25µg), meropenem (10µg), ceftazidima (30µg), cefepime (30µg), cefoxitina (30µg), ciprofloxacina (5µg), cefuroxina axetil (oral, 30µg) e cefuroxina axetil (sódica, 30µg).

2.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada segundo o método proposto por Stepanovic et al. (2000). A partir da padronização das culturas na concentração 0,5 da escala de MacFarland, conforme citado no procedimento para avaliação da resistência a antimicrobianos, 20µL foram inoculados em poços de placas de microtitulação de poliestireno contendo 180µL caldo BHI (para cada amostra, foram utilizados três poços). As placas foram fechadas com tampa e incubadas a 35°C por 24h. Como controle negativo utilizou-se somente caldo BHI (200µL) e como controle positivo utilizou-se 180µL de caldo BHI e 20µL da solução padronizada com o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 25923), previamente testado considerado forte formador de biofilme. Após o crescimento, as amostras foram lavadas três vezes com 200µL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) e o biofilme foi fixado na placa com 150µL de metanol P.A. (CH₃OH) durante 20 minutos. Após este período, o metanol foi descartado e as placas foram mantidas invertidas durante 18 horas a 20°C. Para corar o biofilme que foi fixado na placa, foram adicionados 150µL de solução corante Cristal Violeta (0,5%) durante 15 minutos.

As placas foram invertidas e o excesso de corante foi retirado com água corrente, e, em seguida, adicionou-se 150µL de etanol a 95% (CH₃CH₂OH). Após

repouso por 30 minutos foi realizada a quantificação do biofilme bacteriano em um espectrofotometro leitor de placas de microtitulação (Anthos 2010 Type 17 550 4894) em 450 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos três vezes. Os resultados foram calculados a partir do valor da densidade ótica dada na leitura das placas seguindo os critérios propostos por Stepanovic et al., (2007). Foram utilizados os seguintes índices e procedimentos: Do (média dos nove valores da densidade ótica das amostras e do controle positivo); Don (média dos nove valores de absorbância obtidos do controle negativo somado a três vezes o seu desvio padrão); Dof (valor da Do menos a Don). A classificação final foi dada segundo as fórmulas: $Dof \leq Don$ = não formadora de biofilme; $Don < Dof \leq 2 \times Don$ = fraca formadora de biofilme; $2 \times Don < Dof \leq 4 \times Don$ = moderada formadora de biofilme; $4 \times Don < Dof$ = forte formadora de biofilme.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 89 amostras de produtos cárneos avaliados, 17 (19,1%) foram positivas para a presença de *Salmonella* spp. ficando fora do que estabelece a Resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) que define ausência de *Salmonella* spp. para linguiça frescal e carne moída. O micro-organismo foi isolado em amostras de linguiça frescal de origem suína e mista (elaborada com carne suína e bovina) e em carne bovina moída (Tabela 1). Possíveis explicações para este resultado podem estar relacionadas a problemas higiênicos no abate do animal, que poderiam ter propiciado a contaminação da matéria-prima, ou a problemas higiênicos durante a fabricação e venda. Uma das etapas críticas do processo de fabricação pela qual as amostras que apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. foram submetidas é o processo de moagem. Ao ser moída a carne aumenta seu volume e conseqüentemente sua superfície de contato propiciando a incorporação de resquícios de moagens já realizadas no equipamento e que ficaram expostas a temperatura ambiente facilitando assim o desenvolvimento de bactérias (ALMEIDA, GONÇALVES e FRANCO, 2002). Como esses produtos não passam por tratamento térmico as células vegetativas de micro-organismos como *Salmonella* spp. não são destruídas e encontram na carne condições intrínsecas ideais para seu desenvolvimento e multiplicação (DAGUER et al., 2011). Segundo Oliveira et al. (2008) os riscos de contaminação aumentam em produtos que utilizam equipamentos de moagem em seu processo de fabricação pois podem conter peças de difícil limpeza e higienização aumentando o risco de contaminação cruzada.

Tabela 1 - Presença de *Salmonella* spp. em 25 gramas de produtos cárneos comercializados na Região Sul do Rio Grande do Sul

Amostras	Total Positivas (%)		
Linguiça suína frescal	47	13	27,7
Linguiça mista frescal (suína e bovina)	15	3	20,0
Carne bovina moída	12	1	8,3
Cortes de frango	8	0	0
Carne bovina em pedaços	5	0	0
Linguiça de frango frescal	2	0	0

Nolla e Cantos (2005) atentam para o fato de que os maus hábitos dos manipuladores e as condições gerais do ambiente de fabricação dos alimentos são as principais causas da maioria das doenças transmitidas por alimentos. A contaminação cruzada através dos manipuladores pode provir de vários fatores como a falta de higiene pessoal e ineficaz higienização das mãos (Matos et al., 2012). Segundo Alves, Giarreta e Costa (2012) muitos estabelecimentos que processam e vendem carne e produtos a base de carne, como açougues, não dispõem de lavatórios adequados para higienização de mãos e de um número suficiente de prestadores de serviço e nesses casos o próprio manipulador acaba preparando o alimento e recebendo as cédulas de dinheiro. Esses fatores observados nos estudos anteriormente citados podem indicar que a presença de *Salmonella* spp. nas amostras avaliadas de linguiças suína e mista frescal e na carne moída bovina também pode ter sido ocasionada através de contaminação cruzada devido as condições do ambiente de trabalho e aos hábitos dos manipuladores.

Outra característica importante a ser avaliada é que 94,1% das amostras que apresentaram presença de *Salmonella* spp. foram produzidas com carne suína. Castagna et al. (2004) relacionaram a contaminação de embutidos do tipo frescal com a presença de *Salmonella* spp. nos linfonodos submandibulares, nas tonsilas e no conteúdo intestinal de suínos evidenciando assim que, para esse tipo de produto, a contaminação por esse micro-organismos pode ter origem também na contaminação da matéria-prima.

Um fator que também pode ter sido determinante para a presença de *Salmonella* spp. verificada nas amostras de produtos cárneos analisadas são as condições de armazenamento da matéria-prima. Costa et al. (2012) constataram situações irregulares de armazenamento de carne *in natura* em estabelecimentos comerciais na Cidade de Recife, Pernambuco. Vários refrigeradores eram mantidos fora da temperatura de refrigeração adequada propiciando o crescimento microbiano e alguns deles encontravam-se em precárias condições de higiene. Esses fatores também auxiliam a contaminação cruzada possibilitando o desenvolvimento de bactérias patogênicas como *Salmonella* spp.

Os dados obtidos mostram um índice de presença de *Salmonella* spp. semelhante ao encontrado em outras pesquisas realizadas no Brasil. Souza et al. (2014), analisaram 40 amostras de linguiça frescal coletadas em municípios do Estado do Paraná e constataram a presença de *Salmonella* spp. em 15% delas. Dias et al. (2008), avaliaram 67 amostras de produtos cárneos adquiridas em estabelecimentos comerciais do sul do Rio Grande do Sul e constataram presença de *Salmonella* spp. em 4,2% nas amostras de carne bovina moída, 9,5% de linguiça frescal suína e 13,6% de linguiça frescal de frango. Daguer et al. (2011), avaliaram 51 amostras de linguiça frescal suína e de frango obtidas em estabelecimentos situados no Estado do Paraná e encontraram presença de *Salmonella* spp. em 5 (9,8%) delas. Spricigo et al. (2008) avaliaram 200 amostras de linguiça suína tipo frescal obtidas no comércio da Cidade de Lages, Santa Catarina, e observaram presença de *Salmonella* spp. em 27% delas.

Os sintomas clínicos causados pela ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella* spp. estão relacionados com o sorotipo envolvido e variam de sintomas brandos que não necessitam de intervenção médica, febre, diarreia, gastroenterite até septicemia, podendo nesse caso, levar o paciente a óbito (SHINOHARA et al., 2008). Levando em consideração que esse micro-organismo é eliminado em

temperaturas entre 60°C a 75°C (NADVORNY, FIGUEIREDO e SCHMIDT, 2004), se por ventura os consumidores que adquiriram os produtos com presença de *Salmonella* spp. não tenham utilizado tratamento térmico adequado no processo culinário, poderiam estar expostos a desenvolver algum sintoma anteriormente mencionado.

Quanto a capacidade de resistência a antimicrobianos, foram testados 15 isolados de *Salmonella* spp. sendo 11 provenientes de linguiça suína fresca, 3 de linguiça mista fresca e 1 de carne bovina moída. Os resultados estão apontados na Tabela 2.

Tabela 2 - Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *Salmonella* spp. provenientes de produtos cárneos comercializados na Região Sul do Rio Grande do Sul

Antibiótico	Isolado								
	Carne Moida (n=1)			Linguiça Fresca Suína (n=11)			Linguiça Fresca Mista (n=3)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Meropenem (10µg)	1	0	0	10	1	0	3	0	0
Amicacina (30µg)	1	0	0	11	0	0	3	0	0
Ceftazidima (30µg)	1	0	0	10	1	0	2	1	0
Cefepime (30µg)	1	0	0	11	0	0	2	1	0
Gentamicina (10µg)	1	0	0	10	0	1	0	0	3
Cefoxitina (30µg)	1	0	0	10	0	1	3	0	0
Ampicilina (10µg)	1	0	0	9	0	2	0	0	3
Sulfametoxazol (23,75µg) + Trimetoprim (1,25µg)	1	0	0	9	0	2	3	0	0
Cefalotina (30µg)	1	0	0	9	1	1	2	0	1
Ciprofloxacina (5µg)	1	0	0	11	0	0	2	0	1
Cefuroxina Axetil (Oral) (30µg)	1	0	0	11	0	0	2	0	1
Cefuroxina Axetil (Sódica) (30µg)	1	0	0	10	1	0	1	1	1
Amoxicilina (20µg) + Clavulanato (10µg)	1	0	0	9	0	2	0	2	1

S = Sensível; I = Intermediário; R = Resistente

Dos 15 isolados de *Salmonella* spp. avaliados, seis (40%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados e cinco (33,3%) apresentaram multirresistência. Os antimicrobianos com menor eficiência foram a ampicilina(10µg), gentamicina(10µg) e amoxicilina(20µg) mais clavulanato(10µg). Dos 13 antimicrobianos testados, apenas um (amicacina-30µg) apresentou inibição de todos os isolados testados. Spricigo et al. (2008) avaliaram 60 isolados de *Salmonella* spp. e observaram resistência em 56,7% das amostras sendo que 20% delas foram multirresistentes e, diferente dos resultados obtidos nesse estudo, nenhuma amostra foi resistente a amoxicilina mais ácido clavulânico e gentamicina. Dias et al. (2008) avaliaram seis isolados provenientes de carne moída bovina, linguiça fresca suína e de frango e todos foram sensíveis a ampicilina, resultado

esse que também foi diferente do presente estudo onde 5 (33,3%) amostras demonstraram-se resistentes a essa substância. O aumento da resistência bacteriana a agentes antimicrobianos tem sido associada a sua utilização indevida e excessiva em humanos e animais ao longo dos anos (OMS, 2012) e esse fato pode ser uma provável justificativa da eficiência da amoxicilina mais clavulânico e gentamicina para isolados de *Salmonella* spp. em um primeiro momento e anos depois não apresentarem o mesmo efeito.

O alto número de isolados de *Salmonella* spp. multirresistentes a antibióticos encontrado nas amostras é preocupante pois demonstra que esses micro-organismos estão se tornando resistentes a vários tipos de substâncias antibióticas disponíveis no mercado para tratamento de infecções. A OMS (2012) alerta para o fato de que as bactérias estão criando mecanismos de resistência a novas substâncias antibióticas com rapidez superior ao desenvolvimento desses medicamentos e, se não for controlada, bactérias multirresistentes não serão combatidas através dos medicamentos disponíveis, acarretando em consequências imprevisíveis à saúde. Para amenizar esses efeitos, Korb et al. 2011 sugerem que o controle da resistência bacteriana deve ser feita de forma integrada e intersetorial através de ações contínuas que divulguem os malefícios relacionados ao uso indiscriminado e sem necessidade de antibióticos. O ideal é que a prescrição de antibióticos para inibir infecções causadas por bactérias em humanos e animais seja realizada por médicos e veterinários após o isolamento da bactéria e a aplicação de testes de resistência antimicrobiana afim de que substância e dose corretas sejam administradas sem exageros (ARRIAS E CARRILHO, 2012).

Quanto a capacidade de formação de biofilme em superfícies de poliestireno, todos os 15 isolados avaliados foram considerados não formadores. Existem estruturas presentes em *Salmonella* spp. que contribuem significativamente para que este micro-organismo seja capaz de formar biofilme, como por exemplo as fímbrias presentes na estrutura celular de *Salmonella* spp., relatadas por Gibson et al. (2007) como estruturas responsáveis pela formação de biofilmes em superfícies. Apesar dos isolados deste estudo terem apresentado morfologia e reações bioquímicas características de *Salmonella* spp., possuindo provavelmente todas as estruturas celulares como fímbrias, os mesmos não apresentaram a capacidade de formar biofilme. A possível explicação para estes resultados está no fato de que a formação de biofilme não é somente dependente de estruturas celulares como fímbrias, podendo ser expressa ou suprimida dependendo de fatores genéticos que são regulados principalmente por condições ambientais aos quais provavelmente os isolados avaliados não foram submetidos.

4 CONCLUSÃO

A presença de *Salmonella* spp. em 19,1% das amostras avaliadas demonstram falhas e falta de cuidados higiênicos na cadeia de produtos cárneos. Dos isolados obtidos, 40% mostraram resistência a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados e os que apresentaram menor eficiência foram a ampicilina, gentamicina e amoxicilina mais clavulanato. Apenas o antimicrobiano Amicacina (30µg) foi eficaz na inibição de todos os isolados testados. A resistência verificada denota uma situação preocupante considerando que a multirresistência bacteriana pode originar infecções de difícil tratamento. Nenhuma das amostras mostrou-se capaz de formar biofilmes em superfícies de poliestireno.

REFERÊNCIAS

- 1 ALMEIDA, A.S.; GONÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M. *Salmonella* em corte de carne bovina inteiro e moído. **Higiene Alimentar**, v.16, n.96, p.77-81, 2002.
- 2 ALVES, E.; GIARRETA, A.G.; COSTA, F. Higiene pessoal dos manipuladores de alimentos dos shoppings centers da região da grande Florianópolis. **Revista Técnico Científica - IFSC**, v.3, n.1, 2012.
- 3 ARIAS, M.V.B.; CARRILHO, C.M.D.M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.775-790, abr., 2012.
- 4 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução – RDC nº12, de 02/01/2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº7, seção I, p.45-53, 10 jan., 2001.
- 5 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n.62, de 26 de agosto de 2003 - Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 2003.
- 6 BRASIL. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos**. Abr., 2013. 35p.
- 7 CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v.35, n.6, nov./dec., 2005.
- 8 CASTAGNA, S.M.F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M.R.I. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.2, p.141-147, 2004.
- 9 CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana. **CLSI documento M07-A06**, v.23, n.2, 2005a.
- 10 CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. **CLSI documento M100-S15**, v.25, n.1, 2005b.
- 11 COSTA, J.N.P.; SANTOS, V.V.M.; SILVA, G.R.; MOURA, F.M.L.; SIQUEIRA, M.G.F.M.; GURGEL, C.A.B.; MOURA, A.P.B.L. Condições de armazenamento e acondicionamento de carnes in natura comercializadas em minimercados. **Medicina Veterinária**, v.6, n.4, p.10-15, 2012.

- 12 DAGUER, H.; SILVA, H.D.; HIGASHIYAMA, E.T.; ZANETTE, C.M.; BERSOT, L.S. Qualidade de produtos cárneos fabricados sob inspeção federal no Estado do Paraná. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.2, 2011.
- 13 DIAS, P.A.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; COELHO, F.J.O.; TEJADA, T.S.; SEGATTO, M.; TIMM, C.D. Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.3, p.359-363, jul./set., 2008.
- 14 GIBSON, D.L.; WHITE, A.P.; RAJOTTEI, C.M.; KAY, W.W. *agfC* and *agfE* facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella Enteritidis*. **Microbiology**, v.153, p.1131-1140. 2007.
- 15 ISO. International Organization For Standardization, ISO 6579: Amd 1:2007, annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. 2007.
- 16 KORB, A.; BRAMBILLA, D.K.; TEIXEIRA, D.C.; RODRIGUES, R.M. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, v.4, n.1, jul./dez., 2011.
- 17 LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, n.3, p.229-233, 2006.
- 18 MATOS, V.S.R.; GOMES, A.P.P.; SANTOS, V.A.; FREITAS, F.; SILVA, I.M.M. Perfil sanitário da carne bovina in natura comercializada em supermercados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.1, p.187-192, 2012.
- 19 NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.47-51, 2004.
- 20 NOLLA, A.C.; CANTOS, G.A. Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos e aspectos epidemiológicos em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.2, mar./apr., 2005.
- 21 OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; MENDONÇA, A.T.; PICCOLI, R.H. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.6, nov./dec., 2008.
- 22 OMS – Organização Mundial da Saúde. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana**. Genebra, Suíça, 2012.
- 23 PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; MARQUES, D.F.; RODRIGUES, E.C.A.; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades

transmitidas por alimentos causados por *Salmonella enteritidis*. **Revista de Saúde Pública**, v.32, n.5, out., 1998.

- 24 SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; LIMA-FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.5, set./out., 2008.
- 25 SOUZA, C.O.; RAMOS, F.L.P.; MOTA, C.M.; SANTOS, L.V.S.; LOPES, M.L. Resistência antimicrobiana de *Salmonella Typhi* identificadas no Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.2, p.61-65, 2010.
- 26 SOUZA, M.; PINTO, F.G.S.; BONA, E.A.M.; MOURA, A.C. Qualidade higiênico-sanitária e prevalência de sorovares de *Salmonella* em linguças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no Oeste do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.81, n.2, p.107-112, 2014.
- 27 SPRICIGO, D.A.; MATSUMOTO, S.R.; ESPÍNDOLA, M.L.; VAZ, E.K.; FERRAZ, S.M. Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguças suínas tipo frescal em Lages, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.517-520, 2008.
- 28 STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, 40, 175–179, 2000.
- 29 STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. **APMIS**, v.115, p.891–9, 2007.
- 30 YANG, Q.; WANG, F.; JONES, K.L.; MENG, J.; PRINYAWIWATKUL, W.; GE, B. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid, reliable, and robust detection of *Salmonella* in produce. **Food Microbiology**, v.46, p.485-493, 2015.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

5.2 Artigo 2

Comparação entre o Método Molecular 3M MDS[®] e Métodos Fenotípicos para Detecção de *Salmonella* spp. em alimentos

Greici Bergamo^{a,*}, Cláudio Dias Timm^b, Elizabete Helbig^c, Natália Rodrigues Carvalho^d, Eliezer Avila Gandra^d

^aMestrado de Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil.

^bInspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil.

^cFaculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil.

^dCentro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil.

R E S U M O

Os métodos comumente utilizados e aceitos pela maioria dos órgãos governamentais para análise de *Salmonella* spp. utilizam meios de cultura como forma de isolamento e seleção de micro-organismos, levando dias para chegar a um resultado final. Em virtude disso, métodos moleculares vem sendo estudados e disponibilizados, como o 3M MDS[®], apresentando vantagens como especificidade e sensibilidade equivalentes aos métodos de análise já existentes. Dois métodos fenotípicos, MAPA – preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil e MSRV - descrito pelo Anexo D da ISO 6579 e um método baseado em técnicas moleculares (3M MDS[®]) foram comparados afim de que fossem avaliados a sensibilidade e especificidade de cada procedimento. Para tanto, amostras de leite integral UHT artificialmente contaminadas e de linguiças mista fresca e suína fresca comercializadas na Região Sul do Brasil foram avaliadas quanto a presença de *Salmonella* spp. Não houve diferença significativa quanto à detecção de *Salmonella* spp. em amostras de leite UHT artificialmente contaminadas mesmo em concentrações mínimas de unidades formadoras de colônia (10 UFC.teste⁻¹). Para as amostras de linguiça fresca, embora não significativo, os Métodos MSRV e 3M MDS[®] mostraram-se ligeiramente superiores em relação a detecção de *Salmonella* spp. O índice de sensibilidade foi de 97,6% para o Método

* Endereço para correspondência do autor. Tel.: +55 49 9921 8887; +55 53 8154 2825. E-mail: grei_b@hotmail.com

3M MDS[®] e 100% para os Métodos MAPA e MSRV. A especificidade foi de 100% para os três métodos. A partir dos dados obtidos pode-se inferir que o Método 3M MDS[®] e o Método MSRV podem ser alternativas ao Método MAPA utilizado como método oficial no Brasil.

Palavras-Chave: Ágar Semissólido Rappaport Vassiliadis, MSRV, linguiça frescal, Rappaport Vassiliadis, Tetracionato.

1. Introdução

Os procedimentos analíticos para análise microbiológica vem sendo constantemente aperfeiçoados em busca de sua otimização e principalmente a redução de tempo. Os principais métodos para detecção de patógenos em alimentos, aceitos pela maioria dos órgãos governamentais, utilizam meios de cultura como forma de isolamento e seleção de micro-organismos específicos. Comumente são constituídos das etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo em meios de cultura líquidos (caldos), isolamento seletivos e/ou diferenciais em meios de cultura sólidos (ágares) e identificação fenotípica de gênero, espécie ou subespécie por meio de testes bioquímicos e sorológicos. Devido ao grande número de etapas, o resultado conclusivo é obtido após muitos dias de análise, demandando tempo excessivo principalmente para indústrias de alimentos (Soria, Soria, & Bueno 2012).

Na análise de *Salmonella* spp. especificamente, os principais métodos analíticos utilizam na etapa de enriquecimento seletivo os caldos Rappaport Vassiliadis (RV), Selenito Cistina (SC) e Tetracionato (TT) com a finalidade de permitir o pleno desenvolvimento do micro-organismo alvo e inibir bactérias de outros gêneros. No Brasil, o método mais utilizado e reconhecido oficialmente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) está descrito na Instrução Normativa N.62 (Brasil, 2003).

Outro método amplamente utilizado na detecção de *Salmonella* spp. é o MSRV descrito pela *International Organization for Standardization* – ISO 6579, anexo D (ISO, 2007) onde os caldos RV, SC e TT, utilizados no enriquecimento seletivo, são substituídos por um meio semissólido, chamado Ágar Semissólido Rappaport

Vassiliadis. A partir desse meio de cultura é possível enriquecer e isolar seletivamente *Salmonella* spp. diminuindo uma etapa do processo convencional além da vantagem de que o resultado presuntivo pode ser observado em 48h.

Fernandes, et al. (2014) ressaltam que nos métodos que utilizam meios de cultura as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas em função de fatores ambientais e quando são, podem ser difíceis de serem interpretadas e classificadas, além da possibilidade de existência de células viáveis, porém não-cultiváveis.

Nas últimas décadas um número crescente de técnicas baseadas em biologia molecular vem sendo implementadas como alternativa aos métodos fenotípicos, apresentando vantagens como maior especificidade e otimização de tempo de análise. Dentre essas técnicas, está a *Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification* (LAMP) desenvolvida por Notomi et al. (2000). A principal característica do Método LAMP está na sua capacidade de amplificar ácidos nucleicos em condições isotérmicas com resultados conclusivos gerados em um curto período de tempo. Baseado no Método LAMP, a Empresa 3M[®] desenvolveu o sistema de detecção molecular 3M *Molecular Detection System*[®] (3M MDS[®]) que permite a detecção de *Salmonella* spp. em amostras alimentícias em 24 horas. Embora ainda pouco estudado, o Método 3M MDS[®] é validado pela *Association of Official Analytical Chemistry* (Método 031208) (AOAC, 2012).

O objetivo desse trabalho foi estudar o método mais sensível e específico para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos e, para tanto, foram avaliados e comparados um método molecular (3M MDS[®]) e dois métodos fenotípicos (MAPA e MSRV) na identificação de *Salmonella* spp. em amostras de leite integral UHT artificialmente contaminadas e de linguiças mista e suína frescal comercializadas em estabelecimentos comerciais da Região Sul do Brasil.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparo das amostras de leite artificialmente contaminadas

Foram utilizadas para contaminar artificialmente amostras de leite integral, previamente submetidas ao processo UHT, culturas puras de três sorotipos de

Salmonella (*Salmonella agona*, *Salmonella schwarzengrund* e *Salmonella typhimurium*), isoladas de alimentos, pertencentes ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas – RS e sorotipadas pelo Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Laudo n.313/14), duas cepas padrão de *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) como controles positivos, e duas cepas padrão de *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) como controle negativo. Para cada micro-organismo foram inoculadas nas amostras de leite três concentrações bacterianas em duas ou três repetições, totalizando 57 amostras de leite UHT artificialmente contaminadas.

As culturas puras e as cepas padrão controle positivo e negativo foram mantidas sob congelamento em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) com glicerol (*propano-1,2,3-triol*) na proporção de 750µL de BHI para 250µL de glicerol. Após um processo de descongelamento em temperatura ambiente, as culturas foram transferidas para Caldo BHI e incubadas a 37°C durante 24h. Em seguida, transferiu-se uma alíquota para ágar seletivos *Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose* (BPLS) e *Xylose Lysine Deoxycholate Modified* (XLD) e incubou-se a 37°C durante 24h afim de realizar a confirmação da pureza das culturas a partir da morfologia das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Uma alíquota de 100µL de Caldo BHI com crescimento bacteriano de 24 horas de incubação a 37°C foi semeado em Ágar Triptona de Soja (TSA) e incubado a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, transferiu-se uma alíquota das culturas cultivadas em TSA para tubos com água salina (NaCl a 0,85%) e ajustou-se a concentração bacteriana para escala 0,5 de MacFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹. A partir da padronização foram realizadas diluições decimais até 10¹ UFC.mL⁻¹, sendo selecionadas concentrações bacterianas de forma a obter 10¹ Unidades Formadoras de Colônias por teste (10¹ UFC.teste⁻¹), 10² UFC.teste⁻¹ e 10³ UFC.teste⁻¹. Cada concentração bacteriana selecionada foi semeada em duplicata em Ágar TSA com incubação a 37°C por 24 horas para verificação exata da quantidade de Unidades Formadoras de Colônias utilizada em cada ensaio (Tabela 1). A partir da padronização na escala de MacFarland, 2,5mL da solução bacteriana foram adicionados a 22,5mL de leite integral UHT, totalizando em 25mL de amostra.

2.2. Preparo das Amostras de Linguiça Mista frescal e Suína Frescal

Para avaliar os métodos em relação a detecção de *Salmonella* spp. em “amostras de campo” foram coletadas em estabelecimentos comerciais da Região Sul do Brasil 29 amostras de linguiça vendidas “a granel”, sendo 6 mista frescal (elaborada com carne suína e bovina) e 23 suína frescal. As amostras foram adquiridas na forma como são comercializadas, acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e imediatamente encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas para realização das análises.

2.3. Pré-Enriquecimento das Amostras

Na etapa de pré-enriquecimento, comum aos três métodos de análise, foram utilizados um volume de 25mL de leite integral UHT artificialmente contaminado e para as amostras de linguiça foram utilizadas 25g de amostra e a elas foram acrescentados 225mL de diluente Água Peptonada Tamponada 0,1% (APT). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 37°C por 20 horas e analisadas através das três metodologias avaliadas.

2.4. Avaliação segundo o Método MAPA

O método descrito pela Instrução Normativa N.62 (Brasil, 2003) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, será descrito no decorrer no artigo como método MAPA.

A partir da amostra pré-enriquecida foram transferidos 100µL para um tubo contendo 10mL de Caldo RV e 1mL da amostra para tubos contendo 10mL de Caldo SC e 10mL de Caldo TT seguidos de homogeneização. Os tubos foram incubados a 42°C durante 24 horas e logo após foram semeadas em placas contendo ágar BPLS e ágar XLD sendo incubadas por 37°C por 24 horas. Após esse período, nas placas que apresentaram crescimento com morfologia característica para *Salmonella* spp. foram selecionadas 3 colônias e semeadas em placas contendo ágar nutriente com posterior incubação a 37°C por 24 horas. A partir das colônias obtidas em Ágar

Nutriente realizou-se a identificação bioquímica em tubos com Caldo Uréia, Ágar *Triple Sugar Iron* (TSI) e Ágar *Lysine Iron* (LIA) com incubação a 37°C por 24 horas. As colônias que apresentaram reações características de *Salmonella* spp. nos ágaros TSI, LIA e no Caldo Uréia foram submetidas a testes sorológicos de aglutinação rápida utilizando anti-soros polivalente somático “O” e flagelar “H” para *Salmonella* spp. Quando observada a aglutinação em até 3 minutos, a amostra foi considerada positiva para *Salmonella* spp.

2.5. Avaliação pelo Método MSRV

O método descrito pela International Organization for Standardization – ISO 6579, anexo D (ISO, 2007), será descrito no decorrer no artigo como método MSRV.

A partir da amostra pré-enriquecida, foram retiradas 3 gotas de 33µL que foram inoculadas em locais equidistantes da placa de Ágar Semissólido Rappaport Vassiliadis. E seguida, as placas foram colocadas em sacos plásticos perfurados e incubadas a 42°C por 24 horas.

As amostras que apresentaram motilidade, foram transferidas e semeadas em placas contendo ágar BPLS e ágar XLD sendo incubadas a 37°C por 24 horas. A partir dessa etapa seguiu-se os mesmos procedimentos já descritos no Método MAPA.

2.6. Avaliação pelo Método 3M MDS®

A partir da etapa de pré-enriquecimento, foram transferidos 20µL da amostra para um tubo específico do kit 3M® *Molecular Detection System Salmonella* (MDAS96NA) contendo “solução lysis”. Os tubos passaram por aquecimento a 100°C por 15 minutos e logo em seguida foram resfriados durante 10 minutos em uma temperatura que variou entre -10°C e -20°C. Decorrida a etapa de resfriamento, os tubos que foram agitados e deixados em repouso por 5 minutos. Em seguida 20µL das amostras foram transferidos para “tubos reagentes” do kit contendo os primers específicos para amplificação do DNA alvo (*Salmonella* spp.) (dados não mostrados), moléculas de *Adenosina Fosfossulfato*, substrato *Luciferina* e as enzimas *DNA Polimerase Isotermal*, *ATP Sulfurilase*, e *Luciferase*. Os tubos foram

inseridos no equipamento 3M MDS® para posterior execução da etapa de amplificação de DNA durante 75 minutos. O tempo total de análise foi de aproximadamente 24 horas. O equipamento estava ligado diretamente a um computador e os resultados positivos e negativos para presença de *Salmonella* spp. foram verificados diretamente em software específico acompanhante do equipamento 3M MDS®.

Como controles positivo e negativo do método, 20µL do “reagente controle” foi transferido para um tubo contendo “solução lysis” seguindo o mesmo protocolo aplicado as amostras (100°C/15min.; -10°C a -20°C/10min.; repouso/5min.). Após esse procedimento, 20µL foram transferidos para um “tubo reagente” igual ao utilizado para as amostras avaliadas (controle negativo) e 20µL foram transferidos para um “tubo controle positivo” (controle positivo). Os tubos foram inseridos no equipamento juntamente com as amostras avaliadas durante 75 minutos.

2.7. Análise de Sensibilidade e Especificidade

A partir das amostras de leite UHT artificialmente contaminadas foram calculados os índices de sensibilidade e especificidade com base na fórmula proposta por Beumer, Brinkman, & Rombouts (1991) sendo que:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{n}^{\circ}.\text{de amostras verdadeiro positivas (P)} \times 100}{(\text{P}) + \text{n}^{\circ}.\text{de amostras falso negativas}}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{n}^{\circ}.\text{de amostras verdadeiro negativas (N)} \times 100}{(\text{N}) + \text{n}^{\circ}.\text{de amostras falso positivas}}$$

2.8. Análise Estatística

Para verificar se existiam diferenças significativas entre os métodos em relação a detecção de *Salmonella* spp. nas amostras foi realizada uma análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey a 5% utilizando o Software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

3. Resultados

Entre as 57 amostras avaliadas de leite artificialmente contaminadas apenas em uma (contaminada com 23UFC/teste de *Salmonella enteritidis*) não foi detectada pelo Método 3M MDS®. A presença de *Salmonella* spp. (Tabela 1), nas demais amostras foi verificada pelos três métodos avaliados. Esse resultado, no entanto, não representou diferença significativa entre os três métodos avaliados ($p>0,05$). Quanto as amostras contaminadas com os controles negativos (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* O157:H7) todos os métodos apontaram ausência de *Salmonella* spp em 25 gramas de amostra.

Tabela 1 – Verificação da presença de *Salmonella* spp. através dos Métodos MAPA, MSRV e 3M MDS® em amostras de leite integral UHT contaminadas artificialmente.

Micro-organismo	Método			
	Conc. Bacteriana* (UFC/Teste)	MAPA (P/n)	MSRV (P/n)	3M MDS® (P/n)
<i>Salmonella typhimurium</i> - ATCC 13311	20	2/2	2/2	2/2
	157 a 288	3/3	3/3	3/3
	1605 a 1970	3/3	3/3	3/3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - ATCC 15442	10 a 20	0/3	0/3	0/3
	229 a 728	0/3	0/3	0/3
	1652 a 2235	0/2	0/2	0/2
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 -ATCC 43895	13 a 55	0/3	0/3	0/3
	130 a 413	0/3	0/3	0/3
	2033 a 3515	0/2	0/2	0/2
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	18 a 28	3/3	3/3	2/3
	163 a 215	3/3	3/3	3/3
	1378 a 3825	2/2	2/2	2/2
<i>Salmonella agona</i>	13 a 40	3/3	3/3	3/3
	190 a 558	3/3	3/3	3/3
	1448 a 2755	2/2	2/2	2/2
<i>Salmonella schwarzengrund</i>	18 a 43	3/3	3/3	3/3
	148 a 333	3/3	3/3	3/3
	2415 a 3159	3/3	3/3	3/3
<i>Salmonella typhimurium</i>	10 a 25	3/3	3/3	3/3
	123 a 508	3/3	3/3	3/3
	1425 a 3052	2/2	2/2	2/2

* Concentração bacteriana inoculada nas amostras de leite

(P/n) = “P” representa o número de amostras com resultados positivos para *Salmonella* spp. e “n” o número de amostras avaliadas.

Em relação as 29 amostras de linguiça frescal verificou-se a presença de *Salmonella* spp. em 4 delas (13,8%) sendo que todas eram de origem suína. Dessas quatro amostras, uma foi detectada pelo Método MAPA, quatro pelo Método MSRV

e 3 pelo Método 3M MDS® (Tabela 2). Embora o Método MSRV tenha detectado um número maior de amostras positivas, essa diferença não foi significativa ($p>0,05$) considerando todas as amostras de linguiça avaliadas através dos três métodos. Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas em relação a presença de *Salmonella* spp. na amostras de linguiça suína e mista frescal, se considerarmos que foram encontradas 4 amostras positivas em um total de 23 para o Método MSRV e 1 para 23 para o Método MAPA, esta diferença torna-se relevante considerando o risco para saúde pública.

Tabela 2 - Verificação da presença de *Salmonella* spp. em amostras de linguiça mista frescal (suína e bovina) e suína frescal através dos Métodos MAPA, MSRV e 3M MDS®

Amostra	Método		
	MAPA (P/n)	MSRV (P/n)	3M MDS® (P/n)
Linguiça frescal Suína	1/23	4/23	3/23
Linguiça frescal Mista (Suína e Bovina)	0/6	0/6	0/6
Total de amostras positivas	1	4	3

(P/n) = "P" representa o número de amostras com resultados positivos para *Salmonella* spp. e "n" o número de amostras avaliadas.

A avaliação da sensibilidade e especificidade foi baseada nos resultados verdadeiro positivo, verdadeiro negativo, falso negativo e falso positivo obtidos na análise das amostras de leite UHT artificialmente contaminadas expostos na Tabela 3:

Tabela 3 - Número de amostras positivas, negativas, falso positivas e falso negativas obtidas nos três métodos de análise de leite UHT contaminado artificialmente.

Método	Total de amostras	Positivas	Falso Positivas	Negativas	Falso Negativas
MAPA	57	41	0	16	0
MSRV	57	41	0	16	0
3M MDS®	57	40	0	17	1

Os índices de sensibilidade e especificidade são demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação da especificidade e sensibilidade dos Métodos MAPA, MSRV e 3M MDS® para análise de leite UHT contaminado artificialmente.

Método	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)
MAPA	100	100
MSRV	100	100
3M MDS®	100	97,56

Buscando uma avaliação pontual de cada etapa que compõe os métodos avaliados, em cada método foram observadas o número de amostras que apresentaram resultados falso positivos (FP) em etapas parciais, principalmente na etapa de isolamento seletivo diferencial. Para o Método MAPA, foram avaliadas as amostras FP, com morfologia característica de *Salmonella* spp. na fase de isolamento seletivo diferencial nos ágares XLD e BPLS e não confirmadas nos testes bioquímicos e sorológico; para o Método MSRV, foram consideradas as amostras que apresentaram morfologia característica no ágar Semissólido Rappaport Vassiliadis e não foram confirmadas na fase de isolamento e seleção, testes bioquímicos e sorológico; para o Método MDS[®], foram consideradas como FP parciais as amostras em que o software 3M MDS[®] apontou como duvidosa e teve que ser repetida. É ressaltado que as amostras de Leite UHT contaminadas artificialmente não tiveram resultados parciais FP, apenas verificou-se estes resultados em etapas parciais dos métodos na análise de amostras de campo (linguiças), como podem ser verificados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados falso positivos (FP) em etapas parciais dos Métodos MAPA, MSRV e 3M MDS[®] na verificação da presença de *Salmonella* spp. em amostras de linguiça mista fresca (suína e bovina) e suína fresca

Amostra	Método		
	MAPA (FP/n)	MSRV (FP/n)	3M MDS [®] (FP/n)
Linguiça fresca Suína	11/23	4/23	1/23
Linguiça fresca Mista (Suína e Bovina)	2/6	3/6	0/6
Total de amostras FP	13	7	1

(FP/n) = "FP" representa o número de amostras com resultados falso positivos em etapas parciais dos métodos e "n" o número de amostras avaliadas.

Entre os Métodos MSRV e 3M MDS[®] e entre os Métodos MSRV e MAPA não houveram diferenças significativa em relação a resultados parciais FP ($p>0,05$). Foi observada diferença significativa somente entre os Métodos MAPA e 3M MDS[®] ($p<0,05$). Os resultados destas avaliações são mostrados na Figura 1.

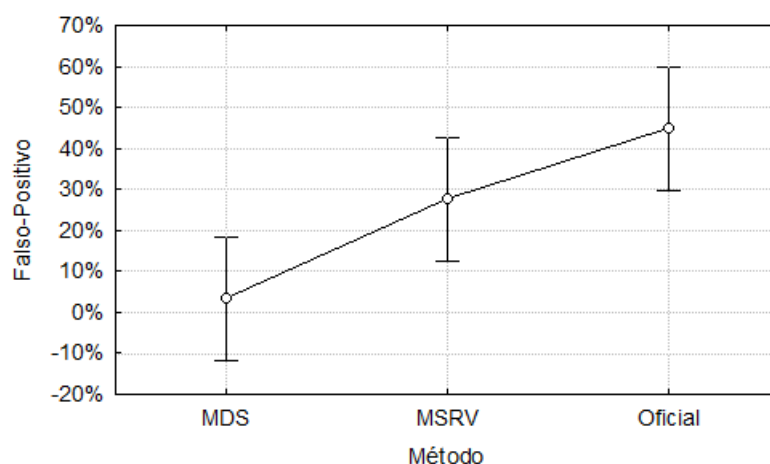


Figura 1 – Média percentual de amostras de campo (linguiças mista frescal e suína frescal) com resultados falsos positivos obtidos em etapas parciais dos Métodos MAPA, MSRV e 3M MDS®.

4. Discussão

Os resultados apresentados no estudo demonstram que não ocorreram diferenças significativas entre os três métodos avaliados tanto em amostras contaminadas artificialmente quanto nas amostras de campo. Isso demonstra que através dos três métodos é possível identificar a presença de *Salmonella* spp. mesmo em concentrações mínimas de unidades formadoras de colônia (10 UFC.teste⁻¹).

Quando avaliado em amostras de campo (linguiças frescas), o Método MRSV mostrou-se ligeiramente superior ao Método MAPA embora essa diferença não tenha sido significativa ($p > 0,05$). Vários estudos vêm relatando a eficiência do Método MSRV em comparação com métodos denominados como “padrão”. Worcman-Barninka, et al. (2001) avaliaram 146 amostras de alimentos compostas por coxas de frango, linguiça suína fresca, coco ralado fresco, cacau em pó e granulado através do método considerado padrão preconizado pela *US Food and Drug Administration* - FDA (Andrews et al., 1995), que utiliza APT para enriquecimento da amostra e os Caldos Mueller–Kauffmann Tetrathionate (MKTT) e RV como meios de enriquecimento seletivo, e pelo Método MSRV (De Smedt et al., 1986). Os autores concluíram que não houve diferença significativa entre os dois métodos e ressaltaram que o MSRV é vantajoso pois apresenta resultado presuntivo em até 48 horas. Kuijpers e Mooijman (2012), realizaram um estudo com vários

laboratórios na União Europeia e compararam os métodos descritos pela *International Organization for Standardization* - ISO 6579 (ISO, 2002) que utiliza os Caldos RV e MKTTn (acrescentado de novobiocina) na etapa de enriquecimento seletivo com a metodologia que emprega o Ágar Semissólido Rappaport Vassiliadis (MSRV) – Anexo D da ISO 6579 (ISO, 2007). Estes autores ao avaliarem amostras de fezes de animais, carne de frango e bovina picada e observaram que o método que emprega o Ágar MSRV foi equivalente ao método padrão com relação a detecção de *Salmonella* spp.

Ao comparar o Método Molecular 3M MDS[®] com os Métodos MAPA e MSRV verificou-se que tanto para as amostras contaminadas artificialmente quanto para as amostras de campo o método foi equivalente. Bird et al. (2013) reuniu estudos comparativos de 20 laboratórios nos Estados Unidos comparando o método padrão para detecção de *Salmonella* spp. preconizado pela *Food and Drug Administration* - FDA/BAM (FDA, 2011), que utiliza Caldo Lactosado no enriquecimento das amostras e os caldos Rappaport Vassiliadis e Tetracionato como meios de enriquecimento seletivo; o método preconizado pelo *United States Department of Agriculture* - USDA (USDA, 2001), que utiliza Água Peptonada Tamponada como meio de enriquecimento e os caldos Rappaport Vassiliadis e Tetracionato Hajna como meios de enriquecimento seletivo; e o Método 3M MDS[®] (AOAC, 2012). Ao total, foram analisadas 1.516 amostras sendo 81 de carne moída crua (contaminadas artificialmente com *Salmonella ohio*) e 4.840 de alimentos para cães elaborados com carne em molho (contaminadas artificialmente com *Salmonella poona*). Os resultados obtidos mostraram que não houve diferenças significativas entre os três métodos avaliados. Esses resultados condizem com os resultados demonstrados na presente pesquisa, onde verificou-se que tanto para as amostras contaminadas artificialmente quando para as amostras de campo o Método 3M MDS[®] foi equivalente ao Método MAPA e MSRV.

Os cálculos propostos por Beumer, Brinkman, & Rombouts (1991) para avaliar a sensibilidade e especificidade levam em consideração a quantidade de amostras falso-negativas (amostras positivas para a presença de *Salmonella* spp. mas avaliadas pelo método como negativas) e falso positivas (amostras negativas para a presença de *Salmonella* spp. mas apontadas pelo método como positivas) dos métodos. Com relação a sensibilidade, quanto maior o número de amostras com

resultados falso negativos menor será sensibilidade do método. Quanto a esse parâmetro, o Método 3M MDS[®] mostrou-se ligeiramente inferior (97,6%) enquanto que os demais métodos mostraram-se 100% sensíveis. A especificidade por sua vez leva em consideração o número de amostras falso positivas e, para esse aspecto, todos os métodos demonstraram-se 100% sensíveis.

O grande diferencial observado foi em relação ao número de amostras Falso-Positivas em etapas parciais dos métodos, principalmente na etapa de isolamento nos meios seletivos e diferenciais, onde verificou-se características típicas de *Salmonella* spp. em algumas etapas do processo mas que ao final das provas bioquímicas e sorológicas não confirmam a presença de *Salmonella* spp.

No Método MAPA, das 29 amostras de campo avaliadas, 14 delas foram suspeitas de *Salmonella* spp. nos meios de isolamento seletivo e diferencial e a análise teve que ser realizada até a etapa final. Apenas uma destas 1 amostras confirmou a presença do micro-organismo, indicando um percentual de 44,8% de amostras FP nos meios de isolamento. Se essa condição ocorresse em um laboratório de uma indústria de alimentos, cerca de metade de toda a produção estaria “suspeita” de presença de *Salmonella* spp. e seria liberada somente após 6 dias do início da análise. Resultado semelhante ocorreu com as amostras avaliadas pelo Método MSRV onde 7 amostras mostraram-se FP nos meios de isolamento seletivo e diferencial representando 24,1% do total. Diferente dos demais, o Método 3M MDS[®] apontou apenas 1 amostra de resultado duvidoso (3,4%). Esta diferença foi significativa ($p < 0,05$) na comparação entre o Método 3M MDS[®] e o Método MAPA. A análise do número de amostras com resultados FP em etapas parciais, como nos meios de isolamento seletivo e diferencial é importante pois mostra a dificuldade de alguns meios seletivos em isolar e diferenciar o micro-organismo alvo em meio a possíveis bactérias competidoras e contaminantes (Lee et al., 2015). Além disso as amostras FP nestas etapas parciais geram gastos no preparo dos meios de cultura que precisam ser utilizados nas etapas seguintes além de atrasar o resultado final. As amostras de leite UHT contaminadas artificialmente não apresentaram resultados FP provavelmente porque não haviam micro-organismos competidores possibilitando assim que os meios de cultura tivessem maiores condições de garantir o crescimento da *Salmonella* spp.

Por fim, a partir dos dados obtidos pode-se inferir que o Método 3M MDS® e o Método MSRV podem ser alternativas ao Método MAPA utilizado como método oficial no Brasil.

5. Conclusões

O Método 3M MDS® e os Métodos MAPA e MSRV apresentaram sensibilidade e especificidade equivalentes. Os resultados demonstraram-se similares na identificação de *Salmonella* spp. em amostras de leite integral UHT artificialmente contaminadas e de linguiças mista frescal (elaborada com carne suína e bovina) e suína frescal comercializadas em estabelecimentos comerciais da Região Sul do Brasil.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de estudos concedida e a empresa 3M do Brasil S.A. pelo empréstimo do equipamento 3M MDS®.

Referências

- Andrews, W. H., June, G. A., Sherrod, P., Hammack, T. S., & Amaguana, R. M. (1995). *Salmonella*. In: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition.
- AOAC. (2012). Association of Official Analytical Chemistry. Método 031208. In: Official methods of analysis to AOAC International.
- Beumer, R. R., Brinkman, E., & Rombouts, F. M. (1991). Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp. a comparison with other methods. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 363-374.
- Bird, P., Fisher, K., Boyle, M., Huffman, T., Benzinger, M. J., Bedinghaus, P., Flannery, J., Crowley, E., Agin, J., & Goins, D. (2013). Evaluation of 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Salmonella* for the Detection of *Salmonella* in Selected Foods: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 96, 1-11.
- Brasil. (2003). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.62, de 26 de agosto de 2003 - Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. In: Diário da República Federativa do Brasil.
- De Smedt, J. M., Bolderdijk, R., Rappold, H., & Lautenschlaeger, D. (1986). Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport–Vassiliadis medium. *Journal of Food Protection*, 49, 510–514.
- FDA. (2011). Food and Drug Administration. BAM: *Salmonella*. Bacteriological Analytical Manual, 2011.

- Fernandes, E., Martins, V. C., Nóbrega, C., Carvalho, C. M., Cardoso, F. A., Cardoso, S., Dias, J., Deng, D., Kluskens, L. D., Freitas, P. P., Azeredo, J. (2014). A bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 239-246.
- ISO. (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organisation for Standardisation, ISO 6579 (E).
- ISO. (2007). International Organization For Standardization, ISO 6579: Amd 1:2007, annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.
- Kuijpers, A. F. A., & Mooijman, K. A. (2012). Detection of *Salmonella* in food, feed and veterinary samples by EU laboratories. *Food Research International*, 45, 885–890.
- Lee, K. M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., & Hsieh, J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264–276.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28, e63i-e63vii.
- Soria, M. C., Soria, M. A., Bueno, D. J. (2012). Comparison of 2 culture methods and PCR assays for *Salmonella* detection in poultry feces. *Poultry Science*, 91, 616-626.
- USDA. (2001). United States Department of Agriculture. Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products. Microbiology Laboratory Guidebook, Revision 4.05.
- Statsoft. (2004). Statistica 7,0 for Windows, Computer Program Manual. Tulsa: StatSoft.
- Worrcman-Barninka, D., Destro, M. T., Fernandes, S. A., & Landgraf, M. (2001). Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport–Vassiladis medium (MSRV) for the detection of *Salmonella* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 387–393.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Método 3M MDS[®] e os Métodos MAPA e MSRV apresentaram sensibilidade e especificidade equivalentes. Os resultados demonstraram-se similares na identificação de *Salmonella* spp. em amostras de leite integral UHT artificialmente contaminadas e de linguiças mista e suína frescal comercializadas em estabelecimentos comerciais da Região Sul do Brasil.

A presença de *Salmonella* spp. em 19,1% das amostras de produtos cárneos demonstram falhas e falta de cuidados higiênicos na cadeia de produtos cárneos. Dos isolados obtidos, 40% demonstraram resistência a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados e os que apresentaram menor eficiência foram a ampicilina, gentamicina e amoxicilina mais clavulanato. Apenas o antimicrobiano Amicacina (30µg) foi eficaz na inibição de todos os isolados testados. A resistência verificada denota uma situação preocupante considerando que a multirresistência bacteriana pode originar infecções de difícil tratamento. Nenhuma das amostras mostrou-se capaz de formar biofilmes em superfícies de poliestireno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINETTO, A.; et al. **Formação de biofilme por *Salmonella enteritidis* em diferentes superfícies**. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, nov., 2011.

ALMEIDA, A.S.; GONÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M. ***Salmonella* em corte de carne bovina inteiro e moído**. Higiene Alimentar, São Paulo, v.16, n.96, p.77-81, 2002.

ALVES, E.; et al. **Higiene pessoal dos manipuladores de alimentos dos shoppings centers da região da grande Florianópolis**. Revista Técnico Científica - IFSC, v.3, n.1, 2012.

ANDRADE, R.B.; et al. **Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes***. Arquivos do Instituto Biológico, v.77, n.4, p.741-750, out./dez., 2010.

ANDREWS, W.H.; et al. ***Salmonella*. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual**, 1995.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**. Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF, 2008.

AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. **Método 031208**. Official methods of analysis to AOAC International, apr., 2012.

ARIAS, M.V.B.; CARRILHO, C.M.D.M. **Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há Motivo para Preocupação?** Semina: Ciências Agrárias, v.33, n.2, p.775-790, abr., 2012.

BAJPAI, V.K.; et al. **Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review**. Food Research International, v.45, p.722-734, mar., 2012.

BD - Becton Dickinson GmbH. BD XLD Agar (Ágar de desoxicolato-lisina-xilose). **Instruções de Utilização – Meios em Placas Prontos a Usar**. Abr., 2013.

BERALDO-MASSOLI, M.C.; et al. **Qualidade microbiológica de frango comercializado na Cidade de Jaboticabal, São Paulo**. Revista Investigação, v.13, n.2, jul., 2013.

BEUMER, R.R.; et al. **Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp.: a comparison with other methods**. International Journal of Food Microbiology, v.12, p.363-374, 1991.

BIRD, P.; et al. **Evaluation of 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Salmonella* for the Detection of *Salmonella* in Selected Foods: Collaborative Study.** Journal of AOAC International, v.96, n.6, 2013.

BOROWSKY, L.M. **Comparação de dois métodos de quantificação de *Salmonella* sp. em embutidos suínos.** Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Veterinária – UFGRS – Porto Alegre. Universidade Federal de Porto Alegre, 57f., 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.** Resolução – RDC nº12, de 02/01/2001. Diário Oficial da União, Brasília, nº7, seção I, p.45-53, jan., 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria nº 8 de 23 de janeiro de 1995 - Aprova alterações introduzidas no método analítico de carcaça de aves e pesquisa de *Salmonella*.** Diário Oficial da União, Seção I, p.1182, jan., 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n.62, de 26 de agosto de 2003 - Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.** In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio. Mundial e Brasil.** Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Análise epidemiológica de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil.** Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2008.

BRASIL. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos.** Abr., 2013. 35p.

CARRIQUE-MAS, J.J.; et al. **Comparison of three plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry environmental samples in Great Britain using ISO 6579:2002 (Annex D).** Journal of Applied Microbiology; v.107, n.6, p.1976-1983, dec., 2009.

CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L. ***Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguças e cortes comerciais de frango.** Ciência Rural, v.35, n.6, nov./dec., 2005.

CASTAGNA, S.M.F.; SCHWARZ,P.; CANAL, C.W.; et al. **Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal.** Acta Scientiae Veterinariae, v.32, n.2, p.141-147, 2004.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of *Salmonella* Hadar Infections Associated with Turkey Burgers.** Apr.,

2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/hadar0411/040411/index.html>. Acesso em: 26/11/2013.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of *Salmonella enteritidis* Infections Linked to Ground Beef (Final Update)**. Sept., 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis-07-12/index.html>. Acesso em: 25/11/2013.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of *Salmonella typhimurium* Infections Linked to Ground Beef (Final Update)**. Mar., 2013a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-01-13/index.html>. Acesso em: 26/11/2013.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of *Salmonella montevideo* and *Salmonella mbandaka* Infections Linked to Tahini Sesame Paste (Final Update)**. July, 2013b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/montevideo-tahini-05-13/>. Acesso em: 26/11/2013.

CHIARI, M.F. **Nova Metodologia de Diagnóstico para *Ehrlichia Canis*: PCR X LAMP**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFSCar, São Carlos. Universidade Federal de São Carlos, 2010.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana**. Sexta edição. CLSI documento M07-A06, v.23, n.2, 2005a.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias**. 15th suplemento informativo. CLSI documento M100-S15, v.25, n.1, 2005b.

CORTEZ, A.L.L.; et al. **Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves**. Arquivos do Instituto Biológico, v.73, n.2, p.157-163, abr./jun., 2006.

COSTA, C.A.R. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo**. Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo. Universidade de São Paulo, 127f., 2010.

COSTA, J.N.P.; et al. **Condições de armazenamento e acondicionamento de carnes in natura comercializadas em minimercados**. Medicina Veterinária, v.6, n.4, p.10-15, 2012.

DAGUER, H., et al. **Qualidade de produtos cárneos fabricados sob inspeção federal no Estado do Paraná**. Revista Ciência Animal Brasileira, v.12, n.2, 2011.

DE ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4ed., 389p., 2014.

DE SMEDT, J.M.; et al. **Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport–Vassiliadis medium**. Journal Food Protection, v.49, p.510–514, 1986.

DIAS, P.A; et al. **Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no sul do Rio Grande do SUL, BRASIL**. Arquivos do Instituto Biológico, v.75, n.3, p.359-363, jul./set., 2008.

DICKEL, E.L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de (*Salmonella*) em carcaças de frango para o controle higiênico-sanitário do processo de abate**. Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Veterinária – UFRGS, Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 137f., 2004.

DICKEL, E.L.; et al. **Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente**. Revista Brasileira de Ciências Veterinárias, v.12, n.1/3, p.5-10, jan./dez., 2005.

DUSCH, H.; ALTWEGG, M. **Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species**. Journal of clinical microbiology, v.33, n.4, p.802-804, apr., 1995.

ERIKSSON, E.; ASPAN, A. **Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry**. BioMed Central Veterinary Research, v.3, n.21, 2007.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **BAM: *Salmonella***. Bacteriological Analytical Manual, 2011.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Moon Marina USA Corporation voluntarily recalls frozen raw yellowfin tuna product “Nakauchi Scrape” associated with a multistate outbreak of *Salmonella* infections**. Apr., 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov/safety/recalls/ucm300412.htm>. Acesso em 25/11/2013.

FERNANDES, E.; et al. **A bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells**. Biosensors and Bioelectronics, v.52, p.239-246, 2014.

FERREIRA, E.O, CAMPOS, L.C. ***Salmonella***. Microbiologia. Atheneu, 5ed., 2008.

FLORES, M.L.; et al. **Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da Reação em Cadeia da Polimerase**. Revista Ciência Rural, v.33, n.3, maio, 2003.

FRANCHIN, P.R. **Comparação de metodologias alternativas para detecção de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em carnes e produtos cárneos.** Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Ciências Agrárias – UFSC, Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina, 103f., 2008.

GANDRA, E.A.; et al. **Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos.** Acta Science, Technology and Management. Maringá, v. 30, n.1, 2008.

GIBSON, D.L.; et al. **agfC and agfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella enteritidis*.** Microbiology, v.153, p.1131-1140, 2007.

GOMES-FILHO, V.J.R.; et al. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em galinhas criadas em fundo de quintal (*Gallus gallus domesticus*) e ovos comercializados nas feiras livres na Cidade de Fortaleza, Ceará.** Revista Ciências Agrárias, v.35, n.4, p.1855-1864, jul./ago., 2014.

GOUVÊA, R. **Comparação entre isolamento bacteriológico convencional e PCR na detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas e de campo.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - UFF, Niterói. Universidade Federal Fluminense, 54f., 2009.

GREIG, J.D.; RAVEL, A. **Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution.** International Journal of Food Microbiology, v.130, n.2, 2009.

GUIMARÃES, D.O.; et al. **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.** Química Nova, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, **ISO 6579: detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.** Geneva, 2002. 9p. Amd 1:2007, annex D.

JAY, J.M. **Modern food microbiology.** 5 ed. New York: Chapman & Hall, 1992.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. **Biofilm and disinfection in meat processing plants.** International Biodeterioration & Biodegradation, v.51, p.265–269, 2003.

KAKU, M.; et al. **Surto alimentar por *Salmonella enteritidis* no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.** Revista de Saúde Pública, v.29, n.2, abr., 1995.

KASNOWSKI, M.C.; et al. **Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, n.15, jul., 2010.

KORB, A.; et al. **Riscos para a Saúde Humana do Uso de Antibióticos na Cadeia Produtiva Leiteira**. Revista de Saúde Pública de Santa Catarina, v.4, n.1, jul./dez., 2011.

KUIJPERS, A.F.A.; MOOIJMAN, K.A. **Detection of *Salmonella* in food, feed and veterinary samples by EU laboratories**. Food Research International, v.45, p.885–890, 2012.

LANDGRAF, M.; et al. **Surto de toxinfecção alimentar por *Salmonella bredeney***. Revista de Saúde Pública, v.19, n.1, fev., 1985.

LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. **Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley**. International Journal of Food Microbiology, v.109, n.3, p.229-233, 2006.

LÁZARO, N.S.; et al. **Gênero *Salmonella*: Características Epidemiológicas e Laboratoriais**. Laboratório de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas – Laboratório de Enterobactérias, LRNCEB/LABENT – IOC/VPSRA/FIOCRUZ. Out., 2008.

LEE, K.M.; et al. **Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety**. Food Control, v.47, p.264–276, jan., 2015.

LEITE-JÚNIOR, B.R.C.; et al. **Qualidade microbiológica de alimentos de origem animal comercializados na Região de Minas Gerais**. Revista Vértices, v.15, n.2, p.49-59, maio/ago., 2013.

MANTILLA, S.P.S.; et al. **Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.45, n.2, p.116-121, 2008.

MATOS, V.S.R.; et al. **Perfil sanitário da carne bovina in natura comercializada em supermercados**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.71, n.1, p.187-192, 2012.

MOREIRA, N.M. **Métodos de tipificação de *Salmonella* sp.** Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2012.

MOTA, R.A.; et al. **Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.42, n.6, p.465-470, 2005.

MÜLLER, M. **Comparação da presença de suínos portadores de *Salmonella* sp. no início da fase de terminação e ao abate, em três granjas do Rio Grande do Sul**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRGS, Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 87f., 2005.

MULLIS, K.; et al. **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology, 1986.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. **Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000.** Acta Scientiae Veterinariae, v.32, n.1, p.47-51, 2004.

NOLLA, A.C.; CANTOS, G.A. **Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos e aspectos epidemiológicos em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.** Cadernos de Saúde Pública, v.21, n.2, mar./apr., 2005.

NOTOMI, T. et al. **Loopp-Mediated Isothermal Amplification of DNA.** Nucleic Acids Research, v.28, n.12, apr., 2000.

OLIVEIRA, L.A.T.; et al. **Biofilme na indústria de alimentos.** Revista Higiene Alimentar, v.20, n.141, p.33-35, 2006.

OLIVEIRA, M.M.M., et al. **Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída.** Ciência e Agrotecnologia, v.32, n.6, nov./dec., 2008.

OLIVEIRA, D.C.V. **Produção de biofilme por *Salmonella* sp. isolada de frango.** Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu. Universidade Estadual Paulista, 75f., 2011.

OLIVEIRA, V.L.; TAHAM, T. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em ovos comercializadas na Região do Distrito Federal.** Cadernos de Pós-Graduação da FAZU, v.2, 2011.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana.** Genebra, Suíça, 2012.

PERDONCINI, G.; et al. ***Salmonella* spp. em ovos produzidos em sistema agroecológico.** Revista Agrocientífica, v.1, n.1, p.33-42, jan./jun., 2014.

PERESI, J.T.M.; et. al. **Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella enteritidis*.** Revista de Saúde Pública, v.32, n.5, out., 1998.

PERSING, D.H. **Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches.** Journal of Clinical Microbiology, v.29, n.7, jul., 1991.

PINTO, U.M.; et al. **Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar.** Revista de Nutrição, v.17, n.3, jul./set., 2004.

PISSOLATO, B.; et al. **Salmonella enteritidis: Formação de biofilme em poliestireno por cepas de origem avícola.** XXII Mostra de Iniciação Científica de Ecosustentabilidade. Universidade de Passo Fundo - UPF, nov., 2012.

REIS, R.B.; et al. **Padronização de um teste imunoenzimático para detecção de Salmonella em Alimentos.** Revista Ciência e Tecnologia dos Alimentos, v.22, n.2, maio/ago., 2002.

REVISTA LATICÍNIOS. **3M Food Safety Lança Sistema Inovador de Identificador de Patógenos em Alimentos.** Painel Fermentch, Ano XVII, n.96, mai/jun., 2012.

RODRIGUES, A.E.C. **Desenvolvimento de um Método Voltamétrico para a Avaliação do Crescimento Microbiano.** Dissertação de Mestrado em Ciências. Universidade do Minho, Braga, 142f., 2002.

SALES, L.E.M.; et al. **Avaliação da carne suína in natura comercializada em Mossoró-RN.** Revista Acta Veterinaria Brasilica, v.7, n.4, p.306-310, 2013.

SAMBROOK, J.; et al. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, 2ed., v.3, 1989.

SANTOS, M.A.F. **Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de Theileria annulata.** Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - FCT. Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 50f., out., 2011.

SANTOS, L.R.; et al. **Protocolos para a extração de DNA de Salmonella.** Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, v.27, n.2, p.93-101, 1999.

SANTOS, L.R.; et al. **Identificação de Salmonella através da reação em cadeia pela polimerase (PCR).** Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, v.29, n.2, p.87-92, 2001.

SANTOS, S. **Biologia Molecular e a Detecção de Patógenos.** Food Safety Brazil – Segurança de Alimentos. Abr., 2013. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.com/biologia-molecular-e-a-deteccao-de-patogenos/>>

SHINOHARA, N.K.S.; et al. **Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos.** Revista Ciência & Saúde Coletiva, v.13, n.5, Set./Out., 2008.

SILVA, N.; et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos.** 3 ed. 552p. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SILVA, N.; et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos.** 4 ed. 624p. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVESTRE, M.K.S.; et al. **Avaliação da qualidade da carne bovina in natura comercializada no Município de Alexandria-RN.** Revista Acta Veterinaria

Brasilica, v.7, n.4, p.327-331, 2013.

SOARES, C.M.; et al. **Avaliação do Método MSRV (Draft Annex D/ISO 6579:2002) para detecção de *Salmonella* spp. em Farelo de Soja.** Comunicado Técnico – EMBRAPA – Rio de Janeiro, dez., 2010.

SORIA, M.C.; et al. **Comparison of 2 culture methods and PCR assays for *Salmonella* detection in poultry feces.** Poultry Science, v.91, p.616-626, 2012.

SOUZA, C.M. **Análise microbiológica da carne suína in natura comercializada em feiras livres da Microrregião do Brejo Paraibano.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Agrárias, UFPB – Paraíba. Universidade Federal da Paraíba, 36f., 2012.

SOUZA, C.O.; et al. **Resistência antimicrobiana de *Salmonella typhi* identificadas no Estado do Pará, Brasil.** Rev Pan-Amazônica de Saúde; v.1, n.2, p.61-65, 2010.

SOUZA, M.; et al. **Qualidade higiênico-sanitária e prevalência de sorovares de *Salmonella* em linguças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná, Brasil.** Arquivos do Instituto de Biologia, v.81, n.2, p.107-112, 2014.

SPRICIGO, D.A.; et al. **Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguças suínas tipo frescal em Lages, SC.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.2, p.517-520, 2008.

STATSOFT. **Statistica 7,0 for Windows, Computer Program Manual.** Tulsa: StatSoft, Inc., 2004.

STEPANOVIC, S.; et al. **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.** Journal of Microbiological Methods, v.40, p.175–179, 2000.

STEPANOVIC, S., et al. **Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*.** APMIS, v.115, p.891–899, 2007.

SVS – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos.** Abr., 2013.

TOZETTO, S.M. **Sorotipos e tipagem molecular de isolados de *Salmonella* entérica no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – UFPR. Universidade Federal do Paraná, 83f., 2006.

TRENTIN, D.S.; et al. **Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate.** Revista Liberato, v.14, n.22, p.113-238, jul./dez., 2013.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products**. Microbiology Laboratory Guidebook, Revision 4.05, Washington, 2001.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Public Health Alert for Chicken Products Produced at Three Foster Farms Facilities**. Oct., 2013. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/newsroom/news-releases-statements-and-transcripts/news-release-archives-by-year/archive/2013/pha-100713>. Acesso em 25/11/2013.

VIGNOLI, R.; SEIJA, V. **Principales mecanismos de resistencia antibiótica**. Temas de bacteriología y virología médica. Universidad de la República – Facultad de Medicina, Motevideo – Uruguay, p.649-662, 2008.

VON RUCKERT, D.A.S. **Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoanálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella* spp. em frangos de corte durante o abate**. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – UFV, Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 62f., 2006.

WHO – ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Resistencia a los antimicrobianos**. Nota descriptive n.194, mayo, 2013.

WORCMAN-BARNINKA, D.; et al. **Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport–Vassiladis medium (MSRV) for the detection of *Salmonella* in foods**. International Journal of Food Microbiology, v.64, n.3, p.387–393, mar., 2001.

YAMAGUCHI, M.U.; et al. **Qualidade microbiológica de alimentos e de ambientes de trabalho: pesquisa de *Salmonella* e *Listeria***. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, v.6, n.3, p.417-434, set./dez., 2013.

YANG, Q.; et al. **Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid, reliable, and robust detection of *Salmonella* in produce**. Food Microbiology, v.46, 485-493, 2015.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. **Microbial biofilms in the food processing industry should they be a concern?** International Journal of Food Microbiology, v.23, n.2, p.125-148, 1994.